

**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : C12N 15/82, 9/10, 15/54, A01H 5/00		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/44472
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. November 1997 (27.11.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/02527		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, HU, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 16. Mai 1997 (16.05.97)			
(30) Prioritätsdaten: 196 19 918.2 17. Mai 1996 (17.05.96) DE		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PLANT-TEC BIOTECHNOLOGIE GMBH [DE/DE]; Hermannswerder 14, D-14473 Potsdam (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KOSSMANN, Jens [DE/DE]; Golmer Fichten 9, D-14476 Golm (DE). FROHBERG, Claus [DE/DE]; Blankenhainer Strasse 17, D-12249 Berlin (DE).			
(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Postfach 86 07 67, D-81634 München (DE).			
(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULES CODING SOLUBLE MAIZE STARCH SYNTHASES			
(54) Bezeichnung: NUCLEINSÄUREMOLEKÜLE CODIEREND LÖSLICHE STÄRKESYNTHASEN AUS MAIS			
(57) Abstract			
<p>The description relates to nucleic acid molecules which code enzymes taking part in starch synthesis in plants. These enzymes involve a novel isoform of soluble maize starch synthases. The invention also relates to vectors containing such nucleic acid molecules and host cells which have been transformed with the nucleic acid molecules described, especially transformed plant cells and plants regeneratable from them exhibiting an increased or reduced activity of the proteins described.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Es werden Nucleinsäuremoleküle beschrieben, die Enzyme codieren, die an der Stärkesynthese in Pflanzen beteiligt sind. Bei diesen Enzymen handelt es sich um eine neue Isoform der löslichen Stärkesynthase aus Mais. Weiterhin betrifft diese Erfindung Vektoren, die derartige Nucleinsäuremoleküle enthalten, und Wirtszellen, die mit den beschriebenen Nucleinsäuremolekülen transformiert wurden, insbesondere transformierte Pflanzenzellen und aus diesen regenerierbare Pflanzen, die eine gesteigerte oder verringerte Aktivität der beschriebenen Proteine aufweisen.</p>			

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

## Nucleinsäuremoleküle codierend lösliche Stärkesynthasen aus Mais

Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle, die eine Form der löslichen Stärkesynthase aus Mais codieren. Weiterhin betrifft diese Erfindung Vektoren, Bakterien, sowie mit den beschriebenen Nucleinsäuremolekülen transformierte Pflanzenzellen und aus diesen regenerierbare Pflanzen. Ferner werden Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen beschrieben, die aufgrund der Einführung von DNA-Molekülen, die eine lösliche Stärkesynthase aus Mais codieren, eine in ihren Eigenschaften veränderte Stärke synthetisieren.

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als erneuerbaren Rohstoffquellen in letzter Zeit beigemessen wird, ist es eine der Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Anpassung dieser pflanzlichen Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie zu bemühen. Um eine Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen. Neben Ölen, Fetten und Proteinen stellen Polysaccharide die wesentlichen nachwachsenden Rohstoffe aus Pflanzen dar. Eine zentrale Stellung bei den Polysacchariden nimmt neben Cellulose die Stärke ein, die einer der wichtigsten Speicherstoffe in höheren Pflanzen ist. Hierbei ist Mais eine der interessantesten Pflanzen, da sie die weltweit für die Stärkeproduktion wichtigste Kulturpflanze ist.

Das Polysaccharid Stärke ist ein Polymer aus chemisch einheitlichen Grundbausteinen, den Glucosemolekülen. Es handelt sich dabei jedoch um ein sehr komplexes Gemisch aus unterschiedlichen Molekülformen, die sich hinsichtlich ihres Polymerisationsgrades und des Auftretens von Verzweigungen der Glucoseketten unterscheiden. Daher stellt Stärke keinen einheitlichen Rohstoff dar. Man unterscheidet insbesondere die Amylose-

Stärke, ein im wesentlichen unverzweigtes Polymer aus  $\alpha$ -1,4-glycosidisch verknüpften Glucosemolekülen, von der Amylopektin-Stärke, die ihrerseits ein komplexes Gemisch aus unterschiedlich verzweigten Glucoseketten darstellt. Die Verzweigungen kommen dabei durch das Auftreten von zusätzlichen  $\alpha$ -1,6-glycosidischen Verknüpfungen zustande. In typischen für die Stärkeproduktion verwendeten Pflanzen, wie z.B. Mais oder Kartoffel, besteht die synthetisierte Stärke zu ca. 25 % aus Amylose-Stärke und zu ca. 75 % aus Amylopektin-Stärke.

Um eine möglichst breite Anwendung von Stärke zu ermöglichen, erscheint es wünschenswert, Pflanzen zur Verfügung zu stellen, die in der Lage sind, modifizierte Stärke zu synthetisieren, die sich für verschiedene Verwendungszwecke besonders eignet. Eine Möglichkeit, derartige Pflanzen bereitzustellen, besteht - neben züchterischen Maßnahmen - in der gezielten genetischen Veränderung des Stärkemetabolismus stärkeproduzierender Pflanzen durch gentechnologische Methoden. Voraussetzung hierfür ist jedoch die Identifizierung und Charakterisierung der an der Stärkesynthese und/oder -modifikation beteiligten Enzyme sowie die Isolierung der entsprechenden, diese Enzyme codierende DNA-Moleküle.

Die biochemischen Synthesewege, die zum Aufbau von Stärke führen, sind im wesentlichen bekannt. Die Stärkesynthese in pflanzlichen Zellen findet in den Plastiden statt. In photosynthetisch aktiven Geweben sind dies die Chloroplasten, in photosynthetisch inaktiven, stärkepeichernden Geweben die Amyloplasten.

Die wichtigsten an der Stärkesynthese beteiligten Enzyme sind die Stärkesynthasen sowie die Verzweigungsenzyme. Bei den Stärkesynthasen sind verschiedene Isoformen beschrieben, die alle eine Polymerisierungsreaktion durch Übertragung eines Glucosylrestes von ADP-Glucose auf  $\alpha$ -1,4-Glucane katalysieren. Verzweigungsenzyme katalysieren die Einführung von  $\alpha$ -1,6-Verzweigungen in lineare  $\alpha$ -1,4-Glucane.

Stärkesynthasen können in zwei Klassen eingeteilt werden: die Stärke Korn-gebundenen Stärkesynthasen ("granule-bound starch synthases"; GBSS) und die löslichen Stärkesynthasen ("soluble starch synthases"; SSS). Diese Unterscheidung ist nicht in jedem Fall eindeutig zu treffen, da einige der Stärkesynthasen

sowohl stärkekorngelunden als auch in löslicher Form vorliegen (Denyer et al., Plant J. 4 (1993), 191-198; et al., Plant J. 6 (1994), 151-159). Für verschiedene Pflanzenspezies werden innerhalb dieser Klassen wiederum verschiedene Isoformen beschrieben, die sich hinsichtlich ihrer Abhängigkeit von Startermolekülen unterscheiden (sogenannte "primer dependent" (Typ II) und "primer independent" (Typ I) starch synthases).

Lediglich für die Isoform GBSS I gelang es bisher, die genaue Funktion bei der Stärkesynthese zu ermitteln. Pflanzen, in denen diese Enzymaktivität stark oder vollkommen reduziert ist, synthetisieren eine amylosefreie (sogenannte "waxy") Stärke (Shure et al., Cell 35 (1983), 225-233; Visser et al., Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 289-296; WO 92/11376), so daß diesem Enzym eine entscheidende Rolle bei der Synthese der Amylose-Stärke zugesprochen wird. Dieses Phänomen wird ebenfalls in Zellen der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* beobachtet (Delrue et al., J. Bacteriol. 174 (1992), 3612-3620). Bei *Chlamydomonas* konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß GBSS I nicht nur an der Synthese der Amylose beteiligt ist, sondern auch einen Einfluß auf die Amylopektinsynthese besitzt. In Mutanten, die keine GBSS I-Aktivität aufweisen, fehlt eine bestimmte Fraktion des normalerweise synthetisierten Amylopektins, die längerkettige Glucane aufweist.

Die Funktionen der anderen Isoformen der Stärkekorngelundenen Stärkesynthasen, insbesondere der GBSS II, und der löslichen Stärkesynthasen sind bisher unklar. Es wird angenommen, daß die löslichen Stärkesynthasen zusammen mit Verzweigungsenzymen an der Synthese des Amylopektins beteiligt sind (siehe z.B. Ponstein et al., Plant Physiol. 92 (1990), 234-241) und daß sie eine wichtige Funktion bei der Regulation der Stärkesyntheserate spielen.

Bei Mais wurden zwei Isoformen der Stärkekorngelundenen, sowie zwei bzw. drei Isoformen der löslichen Stärkesynthasen identifiziert (Hawker et al., Arch. Biochem. Biophys. 160 (1974), 530-551; Pollock und Preiss, Arch. Biochem. Biophys. 204 (1980), 578-588; MacDonald und Preiss, Plant Physiol. 78 (1985), 849-852; Mu et al., Plant J. 6 (1994), 151-159).

Eine GBSS I aus Mais codierende cDNA sowie eine genomische DNA sind bereits beschrieben (Shure et al., Cell 35 (1983), 225-

233; Kloesgen et al., Mol. Gen. Genet. 203 (1986), 237-244). Weiterhin ist ein sogenannter "Expressed Sequence Tag" (EST) beschrieben worden (Shen et al., 1994, GenBank Nr.: T14684), dessen abgeleitete Aminosäuresequenz eine starke Ähnlichkeit zur abgeleiteten Aminosäuresequenz der GBSS II aus Erbse (Dry et al., Plant J. 2 (1992), 193-202) und Kartoffel (Edwards et al., Plant J. 8 (1995), 283-294) aufweist. Nucleinsäuresequenzen, die weitere Stärkesynthase-Isoformen aus Mais codieren, lagen jedoch bisher noch nicht vor. cDNA-Sequenzen, die für andere Stärkesynthasen als für die GBSS I codieren, wurden bisher lediglich für Erbse (Dry et al., Plant J. 2 (1992), 193-202), Reis (Baba et al., Plant Physiol. 103 (1993), 565-573) und Kartoffel (Edwards et al., Plant J. 8 (1995), 283-294) beschrieben.

Außer beim Mais wurden lösliche Stärkesynthasen auch in einer Reihe weiterer Pflanzenarten identifiziert. Lösliche Stärkesynthasen sind beispielsweise bis zur Homogenität aus Erbse (Denyer und Smith, Planta 186 (1992), 609-617) und Kartoffel (Edwards et al., Plant J. 8 (1995), 283-294) isoliert worden. In diesen Fällen stellte sich heraus, daß die als SSS II identifizierte Isoform der löslichen Stärkesynthase identisch ist mit der Stärke Korn-gebundenen Stärkesynthase GBSS II (Denyer et al., Plant J. 4 (1993), 191-198; Edwards et al., Plant J. 8 (1995), 283-294). Für einige weitere Pflanzenspezies wurde das Vorhandensein mehrerer SSS-Isoformen mit Hilfe chromatographischer Methoden beschrieben, beispielsweise bei Gerste (Tyynelä und Schulman, Physiologia Plantarum 89 (1993) 835-841; Kreis, Planta 148 (1980), 412-416) und Weizen (Rijven, Plant Physiol. 81 (1986), 448-453). DNA-Sequenzen, die diese Proteine codieren, wurden jedoch bisher nicht beschrieben.

Um weitere Möglichkeiten bereitzustellen, beliebige stärke-speichernde Pflanzen dahingehend zu verändern, daß sie eine modifizierte Stärke synthetisieren, ist es erforderlich, jeweils DNA-Sequenzen zu identifizieren, die weitere Isoformen der Stärkesynthasen codieren.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Nucleinsäuremoleküle zur Verfügung zu stellen, die an der Stärkebiosynthese beteiligte Enzyme codieren und mit deren

Hilfe es möglich ist, gentechnisch veränderte Pflanzen herzustellen, die eine erhöhte oder erniedrigte Aktivität dieser Enzyme aufweisen, wodurch es zu einer Veränderung der chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften der in diesen Pflanzen synthetisierten Stärke kommt.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher Nucleinsäuremoleküle, die Proteine mit der biologischen Aktivität einer löslichen Stärkesynthase des Typs I aus Mais codieren, wobei derartige Moleküle vorzugsweise Proteine codieren, die die unter Seq ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz umfassen. Insbesondere betrifft die Erfindung Nucleinsäuremoleküle, die die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz oder einen Teil davon enthalten, bevorzugt Moleküle, die die in Seq ID No. 1 angegebene codierende Region umfassen bzw. entsprechende Ribonucleotidsequenzen.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle, die eine lösliche Stärkesynthase aus Mais codieren und deren einer Strang mit einem der oben beschriebenen Moleküle hybridisiert oder mit einem komplementären Strang dieser Moleküle.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Nucleinsäuremoleküle, die eine lösliche Stärkesynthase des Typs I aus Mais codieren und deren Sequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von den Nucleotidsequenzen der oben beschriebenen Moleküle abweicht.

Die Erfindung betrifft auch Nucleinsäuremoleküle, die eine Sequenz aufweisen, die zu der gesamten oder einem Teil der Sequenz der obengenannten Moleküle komplementär ist.

Bei den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen kann es sich sowohl um DNA- als auch RNA-Moleküle handeln. Entsprechende DNA-Moleküle sind beispielsweise genomische oder cDNA-Moleküle. Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen dieser Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen,

wie sie beispielsweise in Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) beschrieben sind. Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, können prinzipiell aus jeder beliebigen Maispflanze stammen, die derartige Moleküle besitzt. Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Molekülen hybridisieren, können z.B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken von Maispflanzen oder Maispflanzengewebe isoliert werden. Alternativ können sie durch gentechnische Methoden oder durch chemische Synthese hergestellt sein.

Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nucleinsäuremoleküle kann dabei unter Verwendung der erfindungsgemäßen Moleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Als Hybridisierungsprobe können z.B. Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt die oder im wesentlichen die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz oder Teile dieser Sequenz aufweisen. Bei den als Hybridisierungsprobe verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente handeln, die mit Hilfe der gängigen Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls übereinstimmt. Hat man Gene identifiziert und isoliert, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenzen hybridisieren, ist eine Bestimmung der Sequenz und eine Analyse der Eigenschaften der von dieser Sequenz codierten Proteine erforderlich.

Die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen auch Fragmente, Derivate und allelische Varianten der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle, die eine erfindungsgemäße lösliche Stärkesynthase aus Mais codieren. Unter Fragmenten werden dabei Teile der Nucleinsäuremoleküle verstanden, die lang genug sind, um eines der beschriebenen Proteine zu codieren. Der Ausdruck Derivat bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Sequenzen dieser Moleküle sich



von den Sequenzen der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 40 %, insbesondere eine Identität von mindestens 60 %, vorzugsweise über 80 % und besonders bevorzugt über 90 %. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen können dabei durch Deletion, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

Homologie bedeutet ferner, daß funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nucleinsäuremolekülen oder den durch sie codierten Proteinen, besteht. Bei den Nucleinsäuremolekülen, die homolog zu den oben beschriebenen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Maissorten, oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten handeln, als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten.

Die von den verschiedenen Varianten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können z.B. Enzymaktivität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, Konformation etc. gehören, sowie physikalische Eigenschaften wie z.B. das Laufverhalten in Gelelektrophoresen, chromatographisches Verhalten, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Stabilität; pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc.

Wichtige Charakteristika einer Stärkesynthase sind: i) ihre Lokalisation im Stroma der Plastiden pflanzlicher Zellen; ii) ihre Fähigkeit zur Synthese linearer  $\alpha$ -1,4-verknüpfter Polyglucane unter Verwendung von ADP-Glucose als Substrat. Diese

Aktivität kann wie in Denyer und Smith (Mol. Cell. Biol. 12:186 (1992), 606-617) oder wie in den Beispielen beschrieben bestimmt werden. Bei den durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen codierten Proteine handelt es sich um eine bisher nicht identifizierte und charakterisierte Form einer löslichen Stärkesynthase aus Mais, die dem Typ I ("primer independent") zugeordnet werden kann. Derartige Stärkesynthasen bzw. Nucleinsäuremoleküle, die derartige Proteine codieren, sind bisher aus Mais nicht beschrieben. Das codierte Protein weist eine gewisse Homologie zu einer löslichen Stärkesynthase aus Reis auf (Baba et al., Plant Physiol. 103 (1993), 565 - 573).

Gegenstand der Erfindung sind auch Oligonucleotide, die spezifisch mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül hybridisieren. Derartige Oligonucleotide haben vorzugsweise eine Länge von mindestens 10, insbesondere von mindestens 15 und besonders bevorzugt von mindestens 50 Nucleotiden. Sie sind dadurch gekennzeichnet, daß sie spezifisch mit erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, d.h. nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß mit Nucleinsäuresequenzen, die andere Proteine, insbesondere andere Stärkesynthasen codieren. Die erfindungsgemäßen Oligonucleotide können beispielsweise als Primer für eine PCR-Reaktion verwendet werden. Ebenso können sie Bestandteile von antisense-Konstrukten sein oder von DNA-Molekülen, die für geeignete Ribozyme codieren.

Ferner betrifft die Erfindung Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bacteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle enthalten.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die in den Vektoren enthaltenen Nucleinsäuremoleküle verknüpft mit regulatorischen Elementen, die die Transkription und Synthese einer translatierbaren RNA in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen gewährleisten.

Die Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in prokaryontischen Zellen, beispielsweise in *Escherichia coli*, ist insofern interessant, als daß auf diese Weise eine genauere

Charakterisierung der enzymatischen Aktivitäten der Enzyme, für die diese Moleküle codieren, ermöglicht wird. Es ist insbesondere möglich, das Produkt, das von den entsprechenden Enzymen in Abwesenheit anderer, in der pflanzlichen Zelle an der Stärkesynthese beteiligter Enzyme synthetisiert wird, zu charakterisieren. Dies läßt Rückschlüsse zu auf die Funktion, die das entsprechende Protein bei der Stärkesynthese in der Pflanzenzelle ausübt.

Darüber hinaus ist es möglich, mittels gängiger molekularbiologischer Techniken (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) verschiedenartige Mutationen in die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle einzuführen, wodurch es zur Synthese von Proteinen mit eventuell veränderten biologischen Eigenschaften kommt. Hierbei ist zum einen die Erzeugung von Deletionsmutanten möglich, bei denen durch fortschreitende Deletionen vom 5'- oder vom 3'- Ende der codierenden DNA-Sequenz Nucleinsäuremoleküle erzeugt werden, die zur Synthese entsprechend verkürzter Proteine führen. Durch derartige Deletionen am 5'-Ende der Nucleotidsequenz ist es beispielsweise möglich, Aminosäuresequenzen zu identifizieren, die für die Translokation des Enzyms in die Plastiden verantwortlich sind (Transitpeptide). Dies erlaubt es, gezielt Enzyme herzustellen, die durch Entfernen der entsprechenden Sequenzen nicht mehr in den Plastiden, sondern im Cytosol lokalisiert sind, oder aufgrund der Addition von anderen Signalsequenzen in anderen Kompartimenten lokalisiert sind.

Andererseits ist auch die Einführung von Punktmutationen denkbar an Positionen, bei denen eine Veränderung der Aminosäuresequenz einen Einfluß beispielsweise auf die Enzymaktivität oder die Regulierung des Enzyms hat. Auf diese Weise können z.B. Mutanten hergestellt werden, die einen veränderten  $K_m$ -Wert besitzen oder nicht mehr den normalerweise in der Zelle vorliegenden Regulationsmechanismen über allosterische Regulation oder kovalente Modifizierung unterliegen.

Des weiteren können Mutanten hergestellt werden, die eine veränderte Substrat- oder Produktspezifität aufweisen, wie z.B. Mutanten, die als Substrat ADP-Glucose-6-Phosphat anstatt ADP-Glucose verwenden. Weiterhin können Mutanten hergestellt wer-

den, die ein verändertes Aktivitäts-Temperatur-Profil aufweisen.

Für die gentechnische Manipulation in prokaryontischen Zellen können die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle in Plasmide eingebracht werden, die eine Mutagenese oder eine Sequenzveränderung durch Rekombination von DNA-Sequenzen erlauben. Mit Hilfe von Standardverfahren (vgl. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A laboratory manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA) können Basenaustausche vorgenommen oder natürliche oder synthetische Sequenzen hinzugefügt werden. Für die Verbindung der DNA-Fragmente untereinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden. Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen zur Verfügung stellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Als Analysemethode werden im allgemeinen eine Sequenzanalyse, eine Restriktionsanalyse und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden durchgeführt.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, insbesondere prokaryontische oder eukaryontische Zellen, die mit einem oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind, sowie Zellen, die von derart transformierten Zellen abstammen und ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül oder einen Vektor enthalten. Dabei handelt es sich vorzugsweise um bakterielle Zellen oder pflanzliche Zellen.

Gegenstand der Erfindung sind ferner die Proteine, die durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codiert werden, sowie Verfahren zu deren Herstellung, wobei eine erfindungsgemäße Wirtszelle unter Bedingungen kultiviert wird, die die Synthese des Proteins erlauben, und anschließend das Protein aus den kultivierten Zellen und/oder dem Kulturmedium isoliert wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch transgene Pflanzenzellen, die mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül transformiert, d.h. genetisch modifiziert, wurden, sowie transgene Pflanzenzellen, die von derartig transformierten Zellen abstammen und erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle enthalten.

Durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle ist es nun möglich, mit Hilfe gentechnischer Methoden in den Stärkemetabolismus von Pflanzen einzugreifen, wie es bisher nicht möglich war, und ihn dahingehend zu verändern, daß es zur Synthese einer modifizierten Stärke kommt, die beispielsweise in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis, dem Verzweigungsgrad, der durchschnittlichen Kettenlänge, dem Phosphatgehalt, dem Verkleisterungsverhalten, der Stärkekorngröße und/oder der Stärkekornform im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist. Durch eine Erhöhung der Aktivität der erfindungsgemäßen Proteine, beispielsweise durch Überexpression entsprechender Nucleinsäuremoleküle, oder durch die Bereitstellung von Mutanten, die nicht mehr den zelleigenen Regulationsmechanismen unterliegen und/oder unterschiedliche Temperaturabhängigkeiten in bezug auf ihre Aktivität besitzen, besteht die Möglichkeit der Ertragssteigerung in entsprechend gentechnisch veränderten Pflanzen. Die wirtschaftliche Bedeutung der Möglichkeit des Eingriffs in die Stärkesynthese allein bei Mais ist offensichtlich: Mais ist weltweit die wichtigste Pflanze zur Stärkegewinnung. Ca. 80% der weltweit jährlich produzierten Stärke wird aus Mais gewonnen.

Möglich ist somit die Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in pflanzlichen Zellen, um die Aktivität der entsprechenden löslichen Stärkesynthase zu erhöhen. Ferner ist es möglich, die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle nach dem Fachmann bekannten Methoden zu modifizieren, um erfindungsgemäß Stärkesynthasen zu erhalten, die nicht mehr den zelleigenen Regulationsmechanismen unterliegen, bzw. veränderte Temperaturabhängigkeiten oder Substrat- bzw. Produktspezifitäten aufweisen.

Die erfindungsgemäßen Zellen enthalten ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül, wobei dieses vorzugsweise mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft ist, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten, insbesondere mit einem Promotor. Derartige Zellen lassen sich von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen dadurch unterscheiden, daß sie ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül enthalten, das natürlicherweise in diesen Zellen nicht vorkommt oder dadurch, daß ein solches Molekül an einem Ort im Genom der Zelle integriert vorliegt, an dem es sonst nicht vorkommt, d.h. in einer anderen genomischen Umgebung. Bei der Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in Pflanzen besteht grundsätzlich die Möglichkeit, daß das synthetisierte Protein in jedem beliebigen Kompartiment der pflanzlichen Zelle lokalisiert sein kann. Um die Lokalisation in einem bestimmten Kompartiment zu erreichen, muß die Lokalisation in Plastiden gewährleistende Sequenz deletiert werden und die verbleibende codierende Region gegebenenfalls mit DNA-Sequenzen verknüpft werden, die die Lokalisierung in dem jeweiligen Kompartiment gewährleisten. Derartige Sequenzen sind bekannt (siehe beispielsweise Braun et al., EMBO J. 11 (1992), 3219-3227; Wolter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 846-850; Sonnewald et al., Plant J. 1 (1991), 95-106).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ferner auch Pflanzen, die erfindungsgemäße Zellen enthalten. Diese können z.B. durch Regeneration der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen nach dem Fachmann bekannten Methoden erhalten werden. Bei den transgenen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, insbesondere um stärkesynthetisierende bzw. stärkespeichernde Pflanzen, wie z.B. Getreidearten (Roggen, Gerste Hafer, Weizen etc.), Reis, Mais, Erbse, Maniok oder Kartoffel.

Die Erfindung betrifft ebenfalls Vermehrungsmaterial der erfindungsgemäßen Pflanzen, das erfindungsgemäße Zellen enthält, beispielsweise Früchte, Samen, Knollen, Wurzelstöcke, Sämlinge, Stecklinge, Calluskulturen, Zellkulturen etc.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die aus den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen Pflanzen sowie Vermehrungsmaterial erhältliche Stärke.

Die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren aufgrund der Expression bzw. zusätzlichen Expression eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls eine Stärke, die beispielsweise in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis, dem Verzweigungsgrad, der durchschnittlichen Kettenlänge, dem Phosphatgehalt, dem Verkleisterungsverhalten, der Stärkekorngröße und/oder der Stärkekornform im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist. Insbesondere kann eine solche Stärke im Hinblick auf die Viskosität und/oder die Gelbildungseigenschaften von Kleistern dieser Stärke im Vergleich zu Wildtypstärke verändert sein.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind transgene Maispflanzenzellen, in denen die Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins verringert ist im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle ist es möglich, Maispflanzenzellen und Maispflanzen zu erzeugen, bei denen die Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins verringert ist. Dies führt ebenfalls zur Synthese einer Stärke mit veränderten chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften verglichen mit Stärke aus Wildtyp-Pflanzenzellen.

Die Herstellung von Maispflanzenzellen mit einer verringerten Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins kann beispielsweise erzielt werden durch die Expression einer entsprechenden antisense-RNA, einer sense-RNA zur Erzielung eines Cosuppressionseffektes oder die Expression eines entsprechend konstruierten Ribozyms, das spezifisch Transkripte spaltet, die eines der erfindungsgemäßen Proteine codieren, unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle.

Das Verfahren zur Verringerung der Aktivität erfindungsgemäßer Enzyme in den Pflanzenzellen durch einen Cosuppressionseffekt ist dem Fachmann bekannt und ist beispielsweise in Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340-344), Niebel et al., (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91-103), Flavell et al.

14

(Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995) 43-46), Palaqui und Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-159), Vaucheret et al., (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317), de Borne et al. (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621) und anderen Quellen.

Die Expression von Ribozymen zur Verringerung der Aktivität von bestimmten Enzymen in Zellen ist dem Fachmann ebenfalls bekannt und ist beispielsweise beschrieben in EP-B1 0 321 201. Die Expression von Ribozymen in pflanzlichen Zellen wurde z.B. beschrieben in Feyter et al. (Mol. Gen. Genet. 250 (1996), 329-338).

Vorzugsweise wird zur Reduzierung der Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins in pflanzlichen Zellen eine antisense-RNA exprimiert.

Hierzu kann zum einen ein DNA-Molekül verwendet werden, das die gesamte ein erfindungsgemäßes Protein codierende Sequenz einschließlich eventuell vorhandener flankierender Sequenzen umfaßt, als auch DNA-Moleküle, die nur Teile der codierenden Sequenz umfassen, wobei diese Teile lang genug sein müssen, um in den Zellen einen antisense-Effekt zu bewirken. Es können im allgemeinen Sequenzen bis zu einer Mindestlänge von 15 bp, vorzugsweise einer Länge von 100-500 bp, für eine effiziente antisense-Inhibition insbesondere Sequenzen mit einer Länge über 500 bp verwendet werden. In der Regel werden DNA-Moleküle verwendet, die kürzer als 5000 bp, vorzugsweise Sequenzen, die kürzer als 2500 bp sind.

Möglich ist auch die Verwendung von DNA-Sequenzen, die einen hohen Grad an Homologie zu den Sequenzen der erfindungsgemäßen DNA-Moleküle aufweisen, aber nicht vollkommen identisch sind. Die minimale Homologie sollte größer als ca. 65 % sein. Die Verwendung von Sequenzen mit Homologien zwischen 95 und 100 % ist zu bevorzugen.

Gegenstand der Erfindung sind auch Maispflanzen, die erfindungsgemäße transgene Maispflanzenzellen enthalten. Die Erfindung betrifft ebenfalls Vermehrungsmaterial der erfindungsgemäßen Pflanzen, insbesondere Samen.



Gegenstand der Erfindung ist auch die aus den vorgehend beschriebenen transgenen Maispflanzenzellen, Maispflanzen sowie Vermehrungsmaterial erhältliche Stärke.

Die erfindungsgemäßen transgenen Maispflanzenzellen und Maispflanzen synthetisieren aufgrund der Verringerung der Aktivität eines der erfindungsgemäßen Proteine eine Stärke, die beispielsweise in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis, dem Verzweigungsgrad, der durchschnittlichen Kettenlänge, dem Phosphatgehalt, dem Verkleisterungsverhalten, der Stärkekorngröße und/oder der Stärkekornform im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist. Diese Stärke kann beispielsweise veränderte Viskositäten und/oder Gelbildungseigenschaften ihrer Kleister zeigen im Vergleich zu Stärke aus Wildtyp-Pflanzen.

Die erfindungsgemäßen Stärken können nach dem Fachmann bekannten Verfahren modifiziert werden und eignen sich in unmodifizierter oder modifizierter Form für verschiedene Verwendungen im Nahrungsmittel- oder Nicht-Nahrungsmittelbereich.

Grundsätzlich läßt sich die Einsatzmöglichkeit der Stärke in zwei große Bereiche unterteilen. Der eine Bereich umfaßt die Hydrolyseprodukte der Stärke, hauptsächlich Glucose und Glucanbausteine, die über enzymatische oder chemische Verfahren erhalten werden. Sie dienen als Ausgangsstoff für weitere chemische Modifikationen und Prozesse, wie Fermentation. Für eine Reduktion der Kosten kann hierbei die Einfachheit und kostengünstige Ausführung eines Hydrolyseverfahrens von Bedeutung sein. Gegenwärtig verläuft es im wesentlichen enzymatisch unter Verwendung von Amyloglucosidase. Vorstellbar wäre eine Kosteneinsparung durch einen geringeren Einsatz von Enzymen. Eine Strukturveränderung der Stärke, z.B. Oberflächenvergrößerung des Korns, leichtere Verdaulichkeit durch geringeren Verzweigungsgrad oder eine sterische Struktur, die die Zugänglichkeit für die eingesetzten Enzyme begrenzt, könnte dies bewirken.

Der andere Bereich, in dem die Stärke wegen ihrer polymeren Struktur als sogenannte native Stärke verwendet wird, gliedert sich in zwei weitere Einsatzgebiete:

## 1. Nahrungsmittelindustrie

Stärke ist ein klassischer Zusatzstoff für viele Nahrungsmittel, bei denen sie im wesentlichen die Funktion des Bindens von wäßrigen Zusatzstoffen übernimmt bzw. eine Erhöhung der Viskosität oder aber eine erhöhte Gelbildung hervorruft. Wichtige Eigenschaftsmerkmale sind das Fließ- und Sorptionsverhalten, die Quell- und Verkleisterungstemperatur, die Viskosität und Dickungsleistung, die Löslichkeit der Stärke, die Transparenz und Kleisterstruktur, die Hitze-, Scher- und Säurestabilität, die Neigung zur Retrogradation, die Fähigkeit zur Filmbildung, die Gefrier/Taustabilität, die Verdaulichkeit sowie die Fähigkeit zur Komplexbildung mit z.B. anorganischen oder organischen Ionen.

## 2. Nicht-Nahrungsmittelindustrie

In diesem großen Bereich kann die Stärke als Hilfsstoff für unterschiedliche Herstellungsprozesse bzw. als Zusatzstoff in technischen Produkten eingesetzt. Bei der Verwendung der Stärke als Hilfsstoff ist hier insbesondere die Papier- und Pappeindustrie zu nennen. Die Stärke dient dabei in erster Linie zur Retardation (Zurückhaltung von Feststoffen), der Abbindung von Füllstoff- und Feinstoffteilchen, als Festigungsstoff und zur Entwässerung. Darüber hinaus werden die günstigen Eigenschaften der Stärke in bezug auf die Steifigkeit, die Härte, den Klang, den Griff, den Glanz, die Glätte, die Spaltfestigkeit sowie die Oberflächen ausgenutzt.

### 2.1 Papier- und Pappeindustrie

Innerhalb des Papierherstellungsprozesses sind vier Anwendungsbereiche, nämlich Oberfläche, Strich, Masse und Sprühen, zu unterscheiden.

Die Anforderungen an die Stärke in bezug auf die Oberflächenbehandlung sind im wesentlichen ein hoher Weißegrad, eine angepaßte Viskosität, eine hohe Viskositätsstabilität, eine gute Filmbildung sowie eine geringe Staubbildung. Bei der Verwendung im Strich spielt der Feststoff-

gehalt, eine angepasste Viskosität, ein hohes Bindevermögen sowie eine hohe Pigmentaffinität eine wichtige Rolle. Als Zusatz zur Masse ist eine rasche, gleichmäßige, verlustfreie Verteilung, eine hohe mechanische Stabilität und eine vollständige Zurückhaltung im Papierfließ von Bedeutung. Beim Einsatz der Stärke im Sprühbereich sind ebenfalls ein angepaßter Feststoffgehalt, hohe Viskosität sowie ein hohes Bindevermögen von Bedeutung.

## 2.2 Klebstoffindustrie

Ein großer Einsatzbereich der Stärken besteht in der Klebstoffindustrie, wo man die Einsatzmöglichkeiten in vier Teilbereiche gliedert: die Verwendung als reinem Stärkeleim, die Verwendung bei mit speziellen Chemikalien aufbereiteten Stärkeleimen, die Verwendung von Stärke als Zusatz zu synthetischen Harzen und Polymerdispersionen sowie die Verwendung von Stärken als Streckmittel für synthetische Klebstoffe. 90 % der Klebstoffe auf Stärkebasis werden in den Bereichen Wellpappenherstellung, Herstellung von Papiersäcken, Beuteln und Tüten, Herstellung von Verbundmaterialien für Papier und Aluminium, Herstellung von Kartonagen und Wiederbefeuchtungsleim für Briefumschläge, Briefmarken usw. eingesetzt.

## 2.3 Textil- und Textilpflegemittelindustrie

Ein großes Einsatzfeld für die Stärken als Hilfsmittel und Zusatzstoff ist der Bereich Herstellung von Textilien und Textilpflegemitteln. Innerhalb der Textilindustrie sind die folgenden vier Einsatzbereiche zu unterscheiden: Der Einsatz der Stärke als Schlichtmittel, d.h. als Hilfsstoff zur Glättung und Stärkung des Klettverhaltens zum Schutz gegen die beim Weben angreifenden Zugkräfte sowie zur Erhöhung der Abriebfestigkeit beim Weben, Stärke als Mittel zur Textilaufrüstung vor allem nach qualitätsverschlechternden Vorbehandlungen, wie Bleichen, Färben usw., Stärke als Verdickungsmittel bei der Herstellung von Farbpasten zur Verhinderung von Farbstoffdiffusionen sowie Stärke als Zusatz zu Kettungsmitteln für Nähgarne.

#### 2.4 Baustoffindustrie

Der vierte Einsatzbereich ist die Verwendung der Stärken als Zusatz bei Baustoffen. Ein Beispiel ist die Herstellung von Gipskartonplatten, bei der die im Gipsbrei vermischte Stärke mit dem Wasser verkleistert, an die Oberfläche der Gipsplatte diffundiert und dort den Karton an die Platte bindet. Weitere Einsatzbereiche sind die Beimischung zu Putz- und Mineralfasern. Bei Transportbeton werden Stärkeprodukte zur Verzögerung der Abbindung eingesetzt.

#### 2.5 Bodenstabilisation

Ein weiterer Markt für die Stärke bietet sich bei der Herstellung von Mitteln zur Bodenstabilisation an, die bei künstlichen Erdbewegungen zum temporären Schutz der Bodenpartikel gegenüber Wasser eingesetzt werden. Kombinationsprodukte aus der Stärke und Polymeremulsionen sind nach heutiger Kenntnis in ihrer Erosions- und verkrustungsmindernden Wirkung den bisher eingesetzten Produkten gleichzusetzen, liegen preislich aber deutlich unter diesen.

#### 2.6 Einsatz bei Pflanzenschutz- und Düngemitteln

Ein Einsatzbereich liegt bei der Verwendung der Stärke in Pflanzenschutzmitteln zur Veränderung der spezifischen Eigenschaften der Präparate. So kann die Stärke zur Verbesserung der Benetzung von Pflanzenschutz- und Düngemitteln, zur dosierten Freigabe der Wirkstoffe, zur Umwandlung flüssiger, flüchtiger und/oder übelriechender Wirkstoffe in mikrokristalline, stabile, formbare Substanzen, zur Mischung inkompatibler Verbindungen und zur Verlängerung der Wirkdauer durch Verminderung der Zersetzung eingesetzt werden.

#### 2.7 Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie

Ein weiteres Einsatzgebiet besteht im Bereich der Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie. In der pharmazeutischen Industrie kann die Stärke als Bindemittel für Tabletten oder zur Bindemittelverdünnung in Kapseln einge-

setzt werden. Weiterhin kann die Stärke als Tabletten-sprengmittel dienen, da sie nach dem Schmelzen Flüssigkeit absorbieren und nach kurzer Zeit soweit quellen, daß der Wirkstoff freigesetzt wird. Medizinische Gleit- und Wundpuder basieren aus qualitativen Gründen auf Stärke. Im Bereich der Kosmetik werden Stärken beispielsweise als Träger von Puderzusatzstoffen, wie Düften und Salicylsäure eingesetzt. Ein relativ großer Anwendungsbereich für die Stärke liegt bei Zahnpasta.

#### 2.8 Stärkezusatz zu Kohlen und Briketts

Einen Einsatzbereich bietet die Stärke als Zusatzstoff zu Kohle und Brikett. Kohle kann mit einem Stärkezusatz quantitativ hochwertig agglomeriert bzw. brikettiert werden, wodurch ein frühzeitiges Zerfallen der Briketts verhindert wird. Der Stärkezusatz liegt bei Grillkohle zwischen 4 und 6 %, bei kalorierter Kohle zwischen 0,1 und 0,5 %. Des weiteren gewinnen Stärken als Bindemittel an Bedeutung, da durch ihren Zusatz zu Kohle und Brikett der Ausstoß schädlicher Stoffe deutlich vermindert werden kann.

#### 2.9 Erz- und Kohleschlammaufbereitung

Die Stärke kann ferner bei der Erz- und Kohleschlammaufbereitung als Flockungsmittel eingesetzt werden.

#### 2.10 Gießereihilfsstoff

Ein weiterer Einsatzbereich besteht als Zusatz zu Gießereihilfsstoffen. Bei verschiedenen Gußverfahren werden Kerne benötigt, die aus Bindemittel-versetzten Sänden hergestellt werden. Als Bindemittel wird heute überwiegend Bentonit eingesetzt, das mit modifizierten Stärken, meist Quellstärken, versetzt ist.

Zweck des Stärkezusatzes ist die Erhöhung der Fließfestigkeit sowie die Verbesserung der Bindefestigkeit. Darüber hinaus können die Quellstärken weitere produktionstechnische Anforderungen, wie im kalten Wasser dispergierbar, rehydratisierbar, gut in Sand mischbar und hohes Wasserbindungsvermögen, aufweisen:

### 2.11 Einsatz in der Kautschukindustrie

In der Kautschukindustrie kann die Stärke zur Verbesserung der technischen und optischen Qualität eingesetzt werden. Gründe sind dabei die Verbesserung des Oberflächenglanzes, die Verbesserung des Griffs und des Aussehens, dafür wird Stärke vor der Kaltvulkanisation auf die klebrigen gummierten Flächen von Kautschukstoffen gestreut, sowie die Verbesserung der Bedruckbarkeit des Kautschuks.

### 2.12 Herstellung von Lederersatzstoffen

Eine weitere Absatzmöglichkeit der modifizierten Stärken besteht bei der Herstellung von Lederersatzstoffen.

### 2.13 Stärke in synthetischen Polymeren

Auf dem Kunststoffsektor zeichnen sich folgende Einsatzgebiete ab: die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in den Verarbeitungsprozess (Stärke ist nur Füllstoff, es besteht keine direkte Bindung zwischen synthetischem Polymer und Stärke) oder alternativ die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in die Herstellung von Polymeren (Stärke und Polymer gehen eine feste Bindung ein).

Die Verwendung der Stärke als reinem Füllstoff ist verglichen mit den anderen Stoffen wie Talkum nicht wettbewerbsfähig. Anders sieht es aus, wenn die spezifischen Stärkeeigenschaften zum Tragen kommen und hierdurch das Eigenschaftsprofil der Endprodukte deutlich verändert wird. Ein Beispiel hierfür ist die Anwendung von Stärkeprodukten bei der Verarbeitung von Thermoplasten, wie Polyäthylen. Hierbei werden die Stärke und das synthetische Polymer durch Koexpression im Verhältnis von 1 : 1 zu einem 'master batch' kombiniert, aus dem mit granuliertem Polyäthylen unter Anwendung herkömmlicher Verfahrenstechniken diverse Produkte hergestellt werden. Durch die Einbindung von Stärke in Polyäthylenfolien kann eine erhöhte Stoffdurchlässigkeit bei Hohlkörpern, eine verbesserte Wasserdampfdurchlässigkeit, ein verbessertes Antistatikverhalten, ein verbessertes Antiblockverhalten sowie eine verbesserte Bedruckbarkeit mit wässrigen Farben erreicht werden.

Eine andere Möglichkeit ist die Anwendung der Stärke in Polyurethanschäumen. Mit der Adaption der Stärke-derivate sowie durch die verfahrenstechnische Optimierung ist es möglich, die Reaktion zwischen synthetischen Polymeren und den Hydroxygruppen der Stärken gezielt zu steuern. Das Ergebnis sind Polyurethanfolien, die durch die Anwendung von Stärke folgende Eigenschaftsprofile erhalten: eine Verringerung des Wärmeausdehnungskoeffizienten, Verringerung des Schrumpfverhaltens, Verbesserung des Druck/Spannungsverhaltens, Zunahme der Wasserdampfdurchlässigkeit ohne Veränderung der Wasseraufnahme, Verringerung der Entflammbarkeit und der Aufrißdichte, kein Abtropfen brennbarer Teile, Halogenfreiheit und verminderte Alterung. Nachteile, die gegenwärtig noch vorhanden sind, sind verringerte Druckfestigkeit sowie eine verringerte Schlagfestigkeit.

Die Produktentwicklung beschränkt sich inzwischen nicht mehr nur auf Folien. Auch feste Kunststoffprodukte, wie Töpfe, Platten und Schalen, sind mit einem Stärkegehalt von über 50 % herzustellen. Des weiteren sind Stärke/ Polymermischungen günstig zu beurteilen, da sie eine sehr viel höhere biologische Abbaubarkeit aufweisen.

Außerordentliche Bedeutung haben weiterhin auf Grund ihres extremen Wasserbindungsvermögen Stärkepfropfpolymerisate gewonnen. Dies sind Produkte mit einem Rückgrat aus Stärke und einer nach dem Prinzip des Radikalkettenmechanismus aufgepfropften Seitengitters eines synthetischen Monomers. Die heute verfügbaren Stärkepfropfpolymerisate zeichnen sich durch ein besseres Binde- und Rückhaltevermögen von bis zu 1000 g Wasser pro g Stärke bei hoher Viskosität aus. Die Anwendungsbereiche für diese Superabsorber haben sich in den letzten Jahren stark ausgeweitet und liegen im Hygienebereich mit Produkten wie Windeln und Unterlagen sowie im landwirtschaftlichen Sektor, z.B. bei Saatgutpillierungen.

Entscheidend für den Einsatz der neuen, gentechnisch veränderten Stärken sind zum einen die Struktur, Wassergehalt, Proteingehalt, Lipidgehalt, Fasergehalt, Asche/Phosphatgehalt, Amylose/Amylopektinverhältnis, Molmassenverteilung, Verzweigungsgrad, Korngröße und -form sowie Kristallinität, zum ande-

ren auch die Eigenschaften, die in folgende Merkmale münden: Fließ- und Sorptionsverhalten, Verkleisterungstemperatur, Viskosität, Dickungsleistung, Löslichkeit, Kleisterstruktur und -transparenz, Hitze-, Scher- und Säurestabilität, Retrogradationsneigung, Gelbildung, Gefrier/Taustabilität, Komplexbildung, Jodbindung, Filmbildung, Klebekraft, Enzymstabilität, Verdaulichkeit und Reaktivität.

Die Erzeugung modifizierter Stärken mittels gentechnischer Eingriffe in einer transgenen Pflanze kann zum einen die Eigenschaften der aus der Pflanze gewonnenen Stärke dahingehend verändern, daß weitere Modifikationen mittels chemischer oder physikalischer Verfahren nicht mehr notwendig erscheinen. Zum anderen können die durch gentechnische Verfahren veränderte Stärken weiteren chemischen Modifikationen unterworfen werden, was zu weiteren Verbesserungen der Qualität für bestimmte der oben beschriebenen Einsatzgebiete führt. Diese chemischen Modifikationen sind grundsätzlich bekannt. Insbesondere handelt es sich dabei um Modifikationen durch

- Hitzebehandlung,
- Säurebehandlung,
- Oxidation und
- Veresterungen,

welche zur Entstehung von Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- und Citratstärken führen. Weitere organische Säuren können ebenfalls zur Veresterung eingesetzt werden:

- Erzeugung von Stärkeethern  
Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxylalkylether,  
O-Carboxylmethylether, N-haltige Stärkeether, P-haltige  
Stärkeether, S-haltige Stärkeether
- Erzeugung von vernetzten Stärken
- Erzeugung von Stärke-Pfropf-Polymerisaten

Zur Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in sense- oder antisense-Orientierung in pflanzlichen Zellen wer-



den diese mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Hierzu zählen insbesondere Promotoren. Generell kommt für die Expression jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage. Der Promotor kann dabei so gewählt sein, daß die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. In Bezug auf die Pflanze kann der Promotor homolog oder heterolog sein. Geeignete Promotoren für eine konstitutive Expression sind z.B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus und der Ubiquitin-Promotor aus Mais, für eine knollenspezifische Expression in Kartoffeln der Patatingen-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) oder ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z.B. der ST-LS1-Promotor (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-2451) oder für eine endosperm-spezifische Expression der HMG-Promotor aus Weizen, der USP-Promotor, der Phaseolinpromotor oder Promotoren von Zein-Genen aus Mais.

Ferner kann eine Terminationssequenz vorhanden sein, die der korrekten Beendigung der Transkription dient sowie der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript, dem eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen wird. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (vgl. Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) und sind beliebig austauschbar.

Die vorliegende Erfindung stellt Nucleinsäuremoleküle zur Verfügung, die eine neue in Mais identifizierte Form einer löslichen Stärkesynthase codieren. Dies erlaubt nun sowohl die Identifizierung der Funktion dieser Stärkesynthase bei der Stärkebiosynthese, als auch die Herstellung gentechnisch veränderter Pflanzen, bei denen die Aktivität dieses Enzyms verändert ist. Dies ermöglicht die Synthese einer Stärke mit veränderter Struktur und somit veränderten physikalisch-chemischen Eigenschaften in derartig manipulierten Pflanzen.

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können prinzipiell auch dazu verwendet werden, Pflanzen herzustellen, bei denen die Aktivität der erfindungsgemäßen Stärkesynthase erhöht oder

verringert ist und gleichzeitig die Aktivitäten anderer, an der Stärkebiosynthese beteiligter Enzyme verändert sind. Dabei sind alle Kombinationen und Permutationen denkbar. Durch die Veränderung der Aktivitäten einer oder mehrerer Isoformen der Stärkesynthasen in Pflanzen kommt es zur Synthese einer in ihrer Struktur veränderten Stärke. Durch die Steigerung der Aktivität einer oder mehrerer Isoformen der Stärkesynthasen in den Zellen der stärkespeichernden Gewebe transformierter Pflanzen wie z.B. in dem Endosperm von Mais oder Weizen oder in der Knolle bei der Kartoffel kann es darüber hinaus zu einer Ertragssteigerung kommen. Beispielsweise können Nucleinsäuremoleküle, die für ein erfindungsgemäßes Protein codieren oder entsprechende antisense-Konstrukte, in Pflanzenzellen eingebracht werden, bei denen bereits die Synthese endogener GBSS I-, SSS- oder GBSS II-Proteine aufgrund eines antisense-Effektes oder einer Mutation inhibiert ist oder die Synthese des Verzweigungsenzyms inhibiert ist (wie z.B. beschrieben in WO92/14827 oder der ae-Mutante (Shannon und Garwood, 1984, in Whistler, BeMiller und Paschall, Starch:Chemistry and Technology, Academic Press, London, 2nd Edition: 25-86)).

Soll die Inhibierung der Synthese mehrerer Stärke-Synthasen in transformierten Pflanzen erreicht werden, so können DNA-Moleküle zur Transformation verwendet werden, die gleichzeitig mehrere, die entsprechenden Stärkesynthasen codierenden Regionen in antisense-Orientierung unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors enthalten. Hierbei kann alternativ jede Sequenz unter der Kontrolle eines eigenen Promotors stehen, oder die Sequenzen können als Fusion von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden. Letztere Alternative wird in der Regel vorzuziehen sein, da in diesem Fall die Synthese der entsprechenden Proteine in etwa gleichem Maße inhibiert werden sollte. Weiterhin ist die Konstruktion von Molekülen möglich, die neben Stärkesynthasen codierenden Sequenzen weitere DNA-Sequenzen enthalten, die andere an der Stärkesynthese oder -modifikation beteiligte Proteine codieren. Diese sind jeweils in antisense-Orientierung an einen geeigneten Promotor gekoppelt. Die Sequenzen können hierbei wiederum hintereinandergeschaltet sein und von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden oder aber von getrennten Promotoren transkribiert werden. Für die

Länge der einzeln codierenden Regionen, die in einem derartigen Konstrukt verwendet werden, gilt das, was oben bereits für die Herstellung von antisense-Konstrukten ausgeführt wurde. Eine obere Grenze für die Anzahl der in einem derartigen DNA-Molekül von einem Promotor aus transkribierten antisense-Fragmente gibt es nicht. Das entstehende Transkript sollte aber in der Regel eine Länge von 10 kb, vorzugsweise von 5 kb nicht überschreiten.

Codierende Regionen, die in derartigen DNA-Molekülen in Kombination mit anderen codierenden Regionen in antisense-Orientierung hinter einem geeigneten Promotor lokalisiert sind, können aus DNA-Sequenzen stammen, die für folgende Proteine codieren: Stärkekorngelbundene (GBSS I und II) und lösliche Stärkesynthasen (SSS I und II), Verzweigungsenzyme, "Debranching"-Enzyme, Disproportionierungsenzyme und Stärkephosphorylasen. Dies ist nur eine beispielhafte Aufzählung. Auch die Verwendung anderer DNA-Sequenzen im Rahmen einer derartigen Kombination ist denkbar.

Mit Hilfe derartiger Konstrukte ist es möglich, in Pflanzenzellen, die mit diesen transformiert wurden, die Synthese mehrerer Enzyme gleichzeitig zu inhibieren.

Weiterhin können die Konstrukte in klassische Mutanten eingebracht werden, die für ein oder mehrere Gene der Stärkebiosynthese defekt sind (Shannon und Garwood, 1984, in Whistler, BeMiller und Paschall, Starch: Chemistry and Technology, Academic Press, London, 2nd Edition: 25-86). Diese Defekte können sich auf folgende Proteine beziehen: Stärkekorngelbundene (GBSS I und II) und lösliche Stärkesynthasen (SSS I und II), Verzweigungsenzyme (BE I und II), "Debranching"-Enzyme (R-Enzyme), Disproportionierungsenzyme und Stärkephosphorylasen. Dies ist nur eine beispielhafte Aufzählung.

Mit Hilfe einer derartigen Vorgehensweise ist es weiterhin möglich, in Pflanzenzellen, die mit diesen transformiert wurden, die Synthese mehrerer Enzyme gleichzeitig zu inhibieren.

Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Clonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für E.coli und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien,

pACYC184 usw. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von E.coli-Zellen verwendet. Transformierte E.coli-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet, anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethode zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid-DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden cloniert werden.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, sollte vorteilhafterweise ein selektierbares Markergen anwesend sein.

Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können gegebenenfalls weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so sollte mindestens die rechte Begrenzung, vorteilhafterweise jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, sollte die einzuführende DNA in spezielle Plasmide cloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von

Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E.coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al. Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 181-187). Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium sollte ein Plasmid, das eine vir-Region trägt, enthalten. Die vir-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4, 1-46 und An et al. EMBO J. 4 (1985), 277-287 beschrieben worden.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplastentransformation sind bekannt (vgl. z.B. Willmitzer, L., 1993 Transgenic plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm,

20

G. Reed, A. Bühler, P. Stadler, eds.) Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge).

Während die Transformation dikotyler Pflanzen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, daß auch monokotyle Pflanzen der Transformation mittels *Agrobacterium* basierender Vektoren sehr wohl zugänglich sind (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6 (1994), 271-282).

Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes, die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern.

Spezifisch die Transformation von Mais wird in der Literatur verschiedentlich beschrieben (vgl. z.B. WO95/06128, EP 0 513 849; EP 0 465 875). In EP 292 435 wird ein Verfahren beschrieben, mit Hilfe dessen, ausgehend von einem schleimlosen, weichen (friable) granulösen Mais-Kallus, fertile Pflanzen erhalten werden können. Shillito et al. (Bio/Technology 7 (1989), 581) haben in diesem Zusammenhang beobachtet, daß es ferner für die Regenerierbarkeit zu fertilen Pflanzen notwendig ist, von Kallus-Suspensionskulturen auszugehen, aus denen eine sich teilende Protoplastenkultur, mit der Fähigkeit zu Pflanzen zu regenerieren, herstellbar ist. Nach einer in vitro Kultivierungszeit von 7 bis 8 Monaten erhalten Shillito et al. Pflanzen mit lebensfähigen Nachkommen, die jedoch Abnormalitäten in der Morphologie und der Reproduktivität aufweisen.

Prioli und Söndahl (Bio/Technology 7 (1989), 589) beschreiben die Regeneration und die Gewinnung fertiler Pflanzen aus Mais-Protoplasten der Cateto Mais-Inzuchtlinie Cat 100-1. Die Autoren vermuten, daß die Protoplasten-Regeneration zu fertilen Pflanzen abhängig ist von einer Anzahl verschiedener Faktoren, wie z.B. von Genotyp, vom physiologischen Zustand der Donorzellen und von den Kultivierungsbedingungen.

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der

den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin u.a. vermittelt. Der individuelle gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten.

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al., Plant Cell Reports 5 (1986), 81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften. Von den Pflanzenzellen können Samen gewonnen werden.

Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind.

Figur 1 zeigt schematisch den Vektor pUBIbar.

Ubiquitin-Pro = Ubiquitinpromotor

Intron = Intron aus Mais

nos = Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens  
aus *A. tumefaciens*

35S = 35S-Promotor des CaMV

T35S = 35S-Terminator des CaMV

Figur 2 zeigt schematisch den Vektor pUBI-bar-aMasy

Ubiquitin-Pro = Ubiquitinpromotor

Intron = Intron aus Mais

nos = Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens  
aus *A. tumefaciens*

35S = 35S-Promotor des CaMV

T35S = 35S-Terminator des CaMV

Dieser Vektor enthält in antisense-Orientierung zum Ubiquitinpromotor die in Beispiel 1 beschriebene cDNA, die eine Stärkesynthase aus Mais codiert.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

In den Beispielen verwendete Medien und Lösungen:

20 x SSC	175,3 g NaCl
	88,2 g Natrium-Citrat
	ad 1000 ml mit ddH <sub>2</sub> O
	pH 7,0 mit 10 N NaOH
YT	8 g Bacto-Yeast extract
	5 g Bacto-Tryptone
	5 g NaCl
	ad 1000 ml mit ddH <sub>2</sub> O

Protoplastenisolierungsmedium (100 ml)

Cellulase Onozuka R S (Meiji Seika, Japan)	800 mg
Pectolyase Y 23	40 mg
KNO <sub>3</sub>	200 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	47 mg
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	147 mg
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	250 mg
Rinderserumalbumin (BSA)	20 mg
Glucose	4000 mg
Fructose	4000 mg
Saccharose	1000 mg
pH	5,8
Osmolarität	660 mosm.

Protoplastenwaschlösung 1: wie Protoplastenisolierlösung, aber ohne Cellulase, Pectolyase und BSA

Transformationspuffer

a) Glucose	0,5 M
MES	0,1 %
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	25 mM



pH 5,8  
auf 600 mosm. einstellen

b) PEG 6000-Lösung

Glucose	0,5 M
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	100 mM
Hepes	20 mM
pH	6,5

Dem obigen Puffer unter b) wird PEG 6000 kurz vor Gebrauch der Lösung zugesetzt (40 Gew.-% PEG). Die Lösung wird durch ein 0,45 µm Sterilfilter filtriert.

W5 Lösung

CaCl <sub>2</sub>	125 mM
NaCl	150 mM
KCl	5 mM
Glucose	50 mM

Protoplasten-Kulturmedium (Angaben in mg/l)

KNO <sub>3</sub>	3000
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	350
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	400
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	300

Fe-EDTA und Spurenelemente wie im Murashige-Skoog-Medium (Physiol. Plant, 15 (1962), 473).

m-Inosit	100
Thiamin HCl	1,0
Nicotinsäureamid	0,5
Pyridoxin HCl	0,5
Glycin	2,0
Glucuronsäure	750
Galacturonsäure	750
Galactose	500
Maltose	500

Glucose	.000
Fructose	36.000
Saccharose	30.000
Asparagin	500
Glutamin	100
Prolin	300
Caseinhydrolysat	500
2, 4 Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)	0,5
pH	5,8
Osmolarität	600 mosm.

In den Beispielen werden die folgenden Methoden verwendet:

1. Clonierungsverfahren

Zur Clonierung in E.coli wurde der Vektor pBluescript II SK (Stratagene) verwendet.

2. Bakterienstämme

Für den Bluescript-Vektor und für die pUSP-Konstrukte wurde der E.coli-Stamm DH5 $\alpha$  (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, USA) verwendet. Für die in vivo excision wurde der E.coli-Stamm XL1-Blue verwendet.

3. Transformation von Mais

(a) Herstellung von Protoplasten der Zelllinie DSM 6009

Protoplastenisolierung

2 - 4 Tage, vorzugsweise 3 Tage nach dem letzten Mediumswechsel einer Protoplastensuspensionskultur wird das Flüssigmedium abgesaugt und die zurückbleibenden Zellen mit 50 ml Protoplastenwaschlösung 1 gespült und nochmals trockengesaugt. Zu jeweils 2 g der geernteten Zellmasse wird 10 ml Protoplastenisolierungsmedium gegeben. Die resuspendierten Zellen und Zellaggregate werden bei  $27 \pm 2^\circ \text{C}$  unter leichtem Schütteln (30 bis 40 rpm) 4 bis 6 h im Dunkeln inkubiert.

## Protoplastreinigung

Sobald die Freisetzung von mindestens 1 Mio. Protoplasten/ml erfolgt ist (mikroskopische Beobachtung), wird die Suspension durch ein Edelstahl- und Nylonsieb von 200 bzw. 45  $\mu\text{m}$  Maschenwerte gesiebt. Die Kombination eines 100  $\mu\text{m}$  und eines 60  $\mu\text{m}$  Siebs ermöglicht die Abtrennung der Zellaggregate genauso gut. Das protoplastenhaltige Filtrat wird mikroskopisch beurteilt. Üblicherweise enthält es 98 - 99 % Protoplasten. Der Rest sind unverdaute Einzelzellen. Protoplastenpräparationen mit diesem Reinheitsgrad werden ohne zusätzliche Gradientenzentrifugation für Transformationsexperimente verwendet. Durch Zentrifugation (100 UpM im Aufschwingrotor (100 x g, 3 min) werden die Protoplasten sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und die Protoplasten in Waschlösung 1 resuspendiert. Die Zentrifugation wird wiederholt und die Protoplasten danach im Transformationspuffer resuspendiert.

## (b) Protoplastentransformation

Die in Transformationspuffer resuspendierten Protoplasten werden bei einem Titer von  $0,5 - 1 \times 10^6$  Protoplasten/ml in 10 ml Portionen in 50 ml Polyallomer-Röhrchen eingefüllt. Die zur Transformation verwendete DNA wird in Tris-EDTA (TE) Puffer gelöst. Pro ml Protoplastensuspension werden 20  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA zugegeben. Als Vektor wird dabei ein Phosphinotricinresistenz vermittelndes Plasmid verwendet (vgl. z.B. EP 0 513 849). Nach der DNA-Zugabe wird die Protoplastensuspension vorsichtig geschüttelt, um die DNA homogen in der Lösung zu verteilen. Sofort danach wird tropfenweise 5 ml PEG-Lösung zugetropft.

Durch vorsichtiges Schwenken der Röhrchen wird die PEG-Lösung homogen verteilt. Danach werden nochmals 5 ml PEG-Lösung zugegeben und das homogene Durchmischen wiederholt. Die Protoplasten verbleiben 20 min der PEG-Lösung bei  $\pm 2^\circ \text{C}$ . Danach werden die Protoplasten durch

34

3-minütiges Zentrifugieren (1000 g; 1000 Upm) sedimentiert. Der Überstand wird verworfen. Die Protoplasten werden durch vorsichtiges Schütteln in 20 ml W5-Lösung gewaschen und danach erneut zentrifugiert. Danach werden sie in 20 ml Protoplastenkulturmedium resuspendiert, nochmals zentrifugiert und erneut in Kulturmedium resuspendiert. Der Titer wird auf  $6 - 8 \times 10^5$  Protoplasten/ml eingestellt und die Protoplasten in 3 ml Portionen in Petrischalen ( $\varnothing$  60 mm, Höhe 15 mm) kultiviert. Die mit Parafilm versiegelten Petrischalen werden bei  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  im Dunkeln aufgestellt.

(c) Protoplastenkultur

Während der ersten 2 - 3 Wochen nach der Protoplastenisolierung und -transformation werden die Protoplasten ohne Zugabe von frischem Medium kultiviert. Sobald sich die aus den Protoplasten regenerierten Zellen zu Zellaggregaten mit mehr als 20 - 50 Zellen entwickelt haben, wird 1 ml frisches Protoplastenkulturmedium zugegeben, das als Osmoticum Saccharose (90 g/l) enthält.

(d) Selektion transformierter Maiszellen und Pflanzenregeneration

3 - 10 Tage nach der Zugabe von frischem Medium können die aus Protoplasten entstandenen Zellaggregate auf Agar-Medien mit 100 mg/l L-Phosphinothricin plattiert werden. N6-Medium mit den Vitaminen des Protoplastenkulturmediums, 90 g/l Saccharose und 1,0 mg/l 2,4D ist ebenso geeignet wie ein analoges Medium beispielsweise mit den Makro- und Mikronährsalzen des MS-Mediums (Murashige und Skoog (1962), siehe oben).

Auf dem Selektivmedium können die aus stabil transformierten Protoplasten hervorgegangenen Kalli ungehindert weiterwachsen. Nach 3 - 5 Wochen, vorzugsweise 4 Wochen können die transgenen Kalli auf frisches Selektionsmedium transferiert werden, welches ebenfalls 100

35

mg/l L-Phosphinothricin enthält, das aber kein Auxin mehr enthält. Innerhalb von 3 - 5 Wochen differenzieren ca. 50 % der transgenen Maiskalli, die das L-Phosphinothricinacetyltransferase-Gen in ihr Genom integriert haben, auf diesem Medium in Gegenwart von L-Phosphinothricin erste Pflanzen.

(e) Aufzucht transgener Regeneratpflanzen

Das embryogene transformierte Maisgewebe wird auf hormonfreiem N6-Medium (Chu C.C. et al., Sci. Sin. 16 (1975), 659) in Gegenwart von  $5 \times 10^{-4}$  M L-Phosphinothricin kultiviert. Auf diesem Medium entwickeln sich Maisembryonen, die das Phosphinothricinacetyltransferase-Gen (PAT-Gen) hinreichend stark exprimieren, zu Pflanzen. Nicht transformierte Embryonen oder solche mit nur sehr schwacher PAT-Aktivität sterben ab. Sobald die Blätter der in vitro-Pflanzen eine Länge von 4 - 6 mm erreicht haben, können diese in Erde transferiert werden. Nach Abwaschen von Agarresten an den Wurzeln werden die Pflanzen in ein Gemisch von Lehm, Sand, Vermiculit und Einheitserde im Verhältnis 3:1:1:1 gepflanzt und während der ersten 3 Tage nach dem Verpflanzen bei 90 - 100 % relativer Luftfeuchte an die Erdkultur adaptiert. Die Anzucht erfolgt in einer Klimakammer mit 14 h Lichtperiode ca. 25000 Lux in Pflanzenhöhe bei einer Tag/Nachttemperatur von  $23 \pm 1/17 \pm 1^\circ \text{C}$ . Die adaptierten Pflanzen werden bei einer Luftfeuchte von  $65 \pm 5$  % kultiviert.

4. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe eines DNA-Random Primer Labelling Kits der Firma Boehringer (Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

## Beispiel 1

Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer cDNA, die eine neue Isoform einer Stärkesynthase aus *Zea mays* codiert

Um eine neue lösliche Stärkesynthase aus Mais zu isolieren, wurden polyclonale Antikörper gegen Peptid 1 hergestellt.

Peptid 1: NH<sub>2</sub>-GTGGLRDTVENC-COOH (Seq. ID No. 3)

Dieses Peptid wurde an den KLH-Carrier ("keyhole limpet hemocyanin") gekoppelt und anschließend zur Herstellung polyclonaler Antikörper in Kaninchen verwendet (Eurogentec, Seraing, Belgien).

Der resultierende Antikörper wurde als anti-SS1 bezeichnet.

Der Antikörper anti-SS1 wurde anschließend verwendet, um eine cDNA-Bibliothek aus Mais nach Sequenzen durchzumustern, die lösliche Stärkesynthasen aus Mais codieren. Hierfür wurde eine cDNA-Bibliothek aus Endosperm-polyA<sup>+</sup> RNA, angelegt im Vektor  $\lambda$ -ZAP, verwendet. Zur Analyse der Phagenplaques wurden diese auf Nitrozellulosefilter übertragen, die vorher für 30-60 min. in einer 10 mM IPTG-Lösung inkubiert und anschließend auf Filterpapier getrocknet wurden. Der Transfer erfolgte für 3 h bei 37°C. Anschließend wurden die Filter für 30 min. bei Raumtemperatur in Blockreagenz inkubiert und zweimal für 5-10 min. in TBST-Puffer gewaschen. Die Filter wurden mit dem polyclonalen Antikörper anti-SS1 in geeigneter Verdünnung für 1 h bei Raumtemperatur oder für 16 h bei 4°C geschüttelt. Die Identifizierung von Plaques, die ein Protein exprimierten, das von dem Antikörper anti-SS1 erkannt wurde, erfolgte mit Hilfe des "Blotting detection kit for rabbit antibodies RPN 23" (Amersham UK) nach den Angaben des Herstellers.

Phagenclone der cDNA-Bibliothek, die ein Protein exprimierten, das von dem Antikörper anti-SS1 erkannt wurde, wurden unter Anwendung von Standardverfahren weiter gereinigt. Mit Hilfe der *in vivo* excision-Methode (Stratagene) wurden von positiven Phagenclonen *E.coli*-Clone gewonnen, die ein doppelsträngiges pBlueskript II SK-Plasmid mit der jeweiligen cDNA-Insertion zwischen der *EcoRI*- und der *Xho I*-Schnittstelle des Polylinkers enthalten. Nach Überprüfung der Größe und des Restriktionsmu-

sters der Insertion wurde ein geeigneter Clon einer Sequenzanalyse unterzogen.

## Beispiel 2

### Sequenzanalyse der cDNA-Insertion des Plasmids pSSS1

Aus einem entsprechend Beispiel 1 erhaltenen E. coli-Clon wurde das Plasmid pSSS1 isoliert und seine cDNA-Insertion durch Standardverfahren mittels der Didesoxynucleotidmethode (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467) bestimmt. Die Insertion ist 2383 bp lang und stellt eine partielle cDNA dar. Die Nucleotidsequenz ist unter Seq ID No. 1 angegeben. Die korrespondierende Aminosäuresequenz ist unter Seq ID No. 2 dargestellt.

Eine Sequenzanalyse und ein Sequenzvergleich mit bekannten Sequenzen zeigte, daß die unter Seq ID No. 1 dargestellte Sequenz neu ist und eine neue lösliche Stärkesynthase des Typs I aus Mais codiert. Die partielle codierende Region weist Homologie zu Stärkesynthasen aus verschiedenen Organismen auf, insbesondere zu einer Stärkesynthase aus Reis. Das durch diese cDNA-Insertion oder durch hybridisierende Sequenzen codierte Protein wird im Rahmen dieser Anmeldung als SSS1Zm bezeichnet. Mit Hilfe dieser partiellen cDNA-Sequenz ist es für eine in der Molekularbiologie erfahrene Person ohne weiteres möglich, die gesamte codierende Region enthaltende Vollängenclone zu isolieren und ihre Sequenzen zu bestimmen. Dazu wird z.B. eine blattspezifische cDNA-Expressionsbank aus Zea mays, Linie B73 (Stratagene GmbH, Heidelberg), nach Standardverfahren mittels Hybridisierung mit einem 5'-Fragment der cDNA-Insertion des Plasmids pSSS1 (200 bp) auf Vollängen-Clone hin durchgemustert. So erhaltene Clone werden sodann sequenziert. Eine andere Möglichkeit zum Erhalt der noch fehlenden 5'-terminal gelegenen Sequenzen besteht in der Anwendung der 5'-Race Methode (Stratagene o.vgl. Hersteller).

**Beispiel 3****Konstruktion des Pflanzentransformationsvektor pUBI-bar-aMASY und Herstellung transgener Maispflanzen**

Zur Herstellung eines Pflanzentransformationsvektors, der eine antisense-RNA zu einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül codiert, wurde der Vektor pUBIbar (siehe Figur 1) mit dem Restriktionsenzym HpaI linearisiert und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. In den linearisierten Vektor wurde die gemäß Beispiel 1 isolierte cDNA (ca. 2,4 kb) cloniert, die als EcoRV/SmaI-Fragment aus dem pBluescriptSK-Plasmid gewonnen worden war. Durch Restriktionsanalyse wurde ein Plasmid identifiziert, das die die Stärkesynthase aus Mais codierende cDNA in antisense-Orientierung im Verhältnis zum Promotor enthielt. Dieses Plasmid wurde pUBI-bar-aMasY genannt. Dieser Vektor enthält einen Ubiquitin-Promotor und ein Intron aus Mais (Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18 (1992), 675-689), das Transkriptionsterminationssignal des Nopalinsynthase-Gens aus *A. tumefaciens* (Depicker et al., J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982), 561-573), das bar-Markergen (Thompson et al., EMBO J. 6 (1987), 2519-2523), das die codierende Region des Bialaphos-Resistenzgens aus *Streptomyces hygroscopicus* umfaßt, sowie den 35S-Promotor und -Terminator des CaMV (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294) in Verbindung mit dem bar-Gen. Ferner enthält das Plasmid zwischen dem Intron und dem nos-Terminator in antisense-Orientierung zum Ubiquitin-Promotor die cDNA codierend die Stärkesynthase aus Mais.

Das Plasmid ist in Figur 2 dargestellt.

Der Vektor pUBI-bar-aMasY wurde mittels der oben beschriebenen Methode in Maisprotoplasten eingeführt. Es wurden dabei  $4,8 \times 10^7$  Protoplasten verwendet und 100 µg Plasmid-DNA.

Es wurden 408 Phosphinothricin-resistente Clone erhalten. Von diesen wurden 40 hinsichtlich der Expression der eingebrachten DNA analysiert. Dies ergab, daß 12 der erhaltenen Clone, die eingebrachte DNA exprimierten. Sechs dieser Clone wurden zu ganzen Pflanzen regeneriert und ins Gewächshaus transferiert.



(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: PlantTec Biotechnologie GmbH, Forschung & Entwicklung  
(B) STRASSE: Hermannswerder 14  
(C) ORT: Potsdam  
(E) LAND: Deutschland  
(F) POSTLEITZAHL: 14473  
(G) TELEFON: +49 331 275670  
(H) TELEFAX: +49 331 2756777

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Nucleinsaeuremolekuele codierend  
loesliche Staerkesynthese aus Mais

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 3

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 2383 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Doppelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Zea mays  
(F) GEWEBETYP: Endosperm

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS  
(B) LAGE: 2..1950  
(D) SONSTIGE ANGABEN: /Funktion= "Staerkesynthese"  
/Produkt= "loesliche Staerkesynthese"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

G GCA CGA GGT CTG CTC TCC CTC TCC GCA ATG GCG ACG CCC TCG GCC 46  
Ala Arg Gly Leu Leu Ser Leu Ser Ala Met Ala Thr Pro Ser Ala  
1 5 10 15

GTG GGC GCC GCG TGC CTC CTC CTC GCG CGG GCC GCC TGG CCG GCC GCC 94  
Val Gly Ala Ala Cys Leu Leu Leu Ala Arg Ala Ala Trp Pro Ala Ala  
20 25 30

40

GTC	GGC	GAC	CGG	CGC	CCG	CGG	CGG	CTC	CAG	CGC	GTC	CTG	CGC	CGC	142
Val	Gly	Asp	Arg	Ala	Arg	Pro	Arg	Arg	Leu	Gln	Arg	Val	Leu	Arg	Arg
			35					40					45		
CGG	TGC	GTC	GCG	GAG	CTG	AGC	AGG	GAG	GGC	CCC	GCG	CCG	CGC	CCG	ATG
Arg	Cys	Val	Ala	Glu	Leu	Ser	Arg	Glu	Gly	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Met
			50				55					60			
CCA	CCC	GCG	CTG	CTG	GCG	CCC	CCG	CTC	GTG	CCC	GGC	TTC	CTC	GCG	CCG
Pro	Pro	Ala	Leu	Leu	Ala	Pro	Pro	Leu	Val	Pro	Gly	Phe	Leu	Ala	Pro
		65				70					75				
CCG	GCC	GAG	CCC	ACG	GGT	GAG	CCG	GCA	TTG	ACG	CCG	CCG	CCC	GTG	CCC
Pro	Ala	Glu	Pro	Thr	Gly	Glu	Pro	Ala	Leu	Thr	Pro	Pro	Pro	Val	Pro
		80			85					90					95
GAC	GCC	GGC	CTG	GGG	GTC	CTC	GGT	GTC	GAA	CCT	GAA	GGG	ATT	GCT	GAA
Asp	Ala	Gly	Leu	Gly	Val	Leu	Gly	Val	Glu	Pro	Glu	Gly	Ile	Ala	Glu
			100						105					110	
GGT	TCC	ATC	GAT	AAC	ACA	GTA	GTT	GTG	GCA	AGT	GAG	CAA	GAT	TCT	GAG
Gly	Ser	Ile	Asp	Asn	Thr	Val	Val	Val	Ala	Ser	Glu	Gln	Asp	Ser	Glu
			115					120					125		
ATT	GTG	GTT	GGA	AAG	GAG	CAA	GCT	CGA	GCT	AAA	GTA	ACA	CAA	AAC	ATT
Ile	Val	Val	Gly	Lys	Glu	Gln	Ala	Arg	Ala	Lys	Val	Thr	Gln	Asn	Ile
		130					135					140			
GTC	TTT	GTA	ACT	GGC	GAA	GCT	TCT	CCT	TAT	GCA	AAG	TCT	GGG	GGT	CTA
Val	Phe	Val	Thr	Gly	Glu	Ala	Ser	Pro	Tyr	Ala	Lys	Ser	Gly	Gly	Leu
		145				150					155				
GGA	GAT	GTT	TGT	GGT	TCA	TTG	CCA	GTT	GCT	CTT	GCT	GCT	CGT	GGT	CAC
Gly	Asp	Val	Cys	Gly	Ser	Leu	Pro	Val	Ala	Leu	Ala	Ala	Arg	Gly	His
		160			165					170				175	
CGT	GTG	ATG	GTT	GTA	ATG	CCC	AGA	TAT	TTA	AAT	GGT	ACC	TCC	GAT	AAG
Arg	Val	Met	Val	Val	Met	Pro	Arg	Tyr	Leu	Asn	Gly	Thr	Ser	Asp	Lys
			180						185					190	
AAT	TAT	GCA	AAT	GCA	TTT	TAC	ACA	GAA	AAA	CAC	ATT	CGG	ATT	CCA	TGC
Asn	Tyr	Ala	Asn	Ala	Phe	Tyr	Thr	Glu	Lys	His	Ile	Arg	Ile	Pro	Cys
			195					200					205		
TTT	GGC	GGT	GAA	CAT	GAA	GTT	ACC	TTC	TTC	CAT	GAG	TAT	AGA	GAT	TCA
Phe	Gly	Gly	Glu	His	Glu	Val	Thr	Phe	Phe	His	Glu	Tyr	Arg	Asp	Ser
		210					215					220			
GTT	GAC	TGG	GTG	TTT	GTT	GAT	CAT	CCC	TCA	TAT	CAC	AGA	CCT	GGA	AAT
Val	Asp	Trp	Val	Phe	Val	Asp	His	Pro	Ser	Tyr	His	Arg	Pro	Gly	Asn
		225				230					235				

41

TTA TAT GGA GAT AAG T	GGT GCT TTT GGT GAT AAT CAG TTC AGA TAC	766
Leu Tyr Gly Asp Lys	Gly Ala Phe Gly Asp Asn Gln Arg Tyr	
240	245 250 255	
ACA CTC CTT TGC TAT GCT GCA TGT GAG GCT CCT TTG GTC CTT GAA TTG		814
Thr Leu Leu Cys Tyr Ala Ala Cys Glu Ala Pro Leu Val Leu Glu Leu		
260	265 270	
GGA GGA TAT ATT TAT GGA CAG AAT TGC ATG TTT GTT GTC AAT GAT TGG		862
Gly Gly Tyr Ile Tyr Gly Gln Asn Cys Met Phe Val Val Asn Asp Trp		
275	280 285	
CAT GCC AGT CTA GTG CCA GTC CTT CTT GCT GCA AAA TAT AGA CCA TAT		910
His Ala Ser Leu Val Pro Val Leu Leu Ala Ala Lys Tyr Arg Pro Tyr		
290	295 300	
GGT GTT TAT AAA GAC TCC CGC AGC ATT CTT GTA ATA CAT AAT TTA GCA		958
Gly Val Tyr Lys Asp Ser Arg Ser Ile Leu Val Ile His Asn Leu Ala		
305	310 315	
CAT CAG GGT GTA GAG CCT GCA AGC ACA TAT CCT GAC CTT GGG TTG CCA		1006
His Gln Gly Val Glu Pro Ala Ser Thr Tyr Pro Asp Leu Gly Leu Pro		
320	325 330 335	
CCT GAA TGG TAT GGA GCT CTG GAG TGG GTA TTC CCT GAA TGG GCG AGG		1054
Pro Glu Trp Tyr Gly Ala Leu Glu Trp Val Phe Pro Glu Trp Ala Arg		
340	345 350	
AGG CAT GCC CTT GAC AAG GGT GAG GCA GTT AAT TTT TTG AAA GGT GCA		1102
Arg His Ala Leu Asp Lys Gly Glu Ala Val Asn Phe Leu Lys Gly Ala		
355	360 365	
GTT GTG ACA GCA GAT CGA ATC GTG ACT GTC AGT AAG GGT TAT TCA TGG		1150
Val Val Thr Ala Asp Arg Ile Val Thr Val Ser Lys Gly Tyr Ser Trp		
370	375 380	
GAG GTC ACA ACT GCT GAA GGT GGA CAG GGC CTC AAT GAG CTC TTA AGC		1198
Glu Val Thr Thr Ala Glu Gly Gly Gln Gly Leu Asn Glu Leu Leu Ser		
385	390 395	
TCC AGA AAG AGT GTA TTA AAC GGA ATT GTA AAT GGA ATT GAC ATT AAT		1246
Ser Arg Lys Ser Val Leu Asn Gly Ile Val Asn Gly Ile Asp Ile Asn		
400	405 410 415	
GAT TGG AAC CCT GCC ACA GAC AAA TGT ATC CCC TGT CAT TAT TCT GTT		1294
Asp Trp Asn Pro Ala Thr Asp Lys Cys Ile Pro Cys His Tyr Ser Val		
420	425 430	
GAT GAC CTC TCT GGA AAG GCC AAA TGT AAA GGT GCA TTG CAG AAG GAG		1342
Asp Asp Leu Ser Gly Lys Ala Lys Cys Lys Gly Ala Leu Gln Lys Glu		
435	440 445	
CTG GGT TTA CCT ATA AGG CCT GAT GTT CCT CTG ATT GGC TTT ATT GGA		1390
Leu Gly Leu Pro Ile Arg Pro Asp Val Pro Leu Ile Gly Phe Ile Gly		
450	455 460	

AGA	TTG	GAT	TAT	AAA	GGC	ATT	GAT	CTC	ATT	CAA	ATC	ATA	CCA			1438
Arg	Leu	Asp	Tyr	Lys	Gly	Ile	Asp	Leu	Ile	Gln	Leu	Ile	Ile	Pro		
465					470					475						
GAT	CTC	ATG	CGG	GAA	GAT	GTT	CAA	TTT	GTC	ATG	CTT	GGA	TCT	GGT	GAC	1486
Asp	Leu	Met	Arg	Glu	Asp	Val	Gln	Phe	Val	Met	Leu	Gly	Ser	Gly	Asp	
480				485					490						495	
CCA	GAG	CTT	GAA	GAT	TGG	ATG	AGA	TCT	ACA	GAG	TCG	ATC	TTC	AAG	GAT	1534
Pro	Glu	Leu	Glu	Asp	Trp	Met	Arg	Ser	Thr	Glu	Ser	Ile	Phe	Lys	Asp	
			500						505					510		
AAA	TTT	CGT	GGA	TGG	GTT	GGA	TTT	AGT	GTT	CCA	GTT	TCC	CAC	CGA	ATA	1582
Lys	Phe	Arg	Gly	Trp	Val	Gly	Phe	Ser	Val	Pro	Val	Ser	His	Arg	Ile	
			515					520					525			
ACT	GCC	GGC	TGC	GAT	ATA	TTG	TTA	ATG	CCA	TCC	AGA	TTC	GAA	CCT	TGT	1630
Thr	Ala	Gly	Cys	Asp	Ile	Leu	Leu	Met	Pro	Ser	Arg	Phe	Glu	Pro	Cys	
		530					535					540				
GGT	CTC	AAT	CAG	CTA	TAT	GCT	ATG	CAG	TAT	GGC	ACA	GTT	CCT	GTT	GTC	1678
Gly	Leu	Asn	Gln	Leu	Tyr	Ala	Met	Gln	Tyr	Gly	Thr	Val	Pro	Val	Val	
	545					550					555					
CAT	GCA	ACT	GGG	GGC	CTT	AGA	GAT	ACC	GTG	GAG	AAC	TTC	AAC	CCT	TTC	1726
His	Ala	Thr	Gly	Gly	Leu	Arg	Asp	Thr	Val	Glu	Asn	Phe	Asn	Pro	Phe	
560					565					570					575	
GGT	GAG	AAT	GGA	GAG	CAG	GGT	ACA	GGG	TGG	GCA	TTC	GCA	CCC	CTA	ACC	1774
Gly	Glu	Asn	Gly	Glu	Gln	Gly	Thr	Gly	Trp	Ala	Phe	Ala	Pro	Leu	Thr	
			580						585					590		
ACA	GAA	AAC	ATG	TTG	TGG	ACA	TTG	CGA	ACT	GCA	ATA	TCT	ACA	TAC	AGG	1822
Thr	Glu	Asn	Met	Leu	Trp	Thr	Leu	Arg	Thr	Ala	Ile	Ser	Thr	Tyr	Arg	
			595					600					605			
GAA	CAC	AAG	TCC	TCC	TGG	GAA	GGG	CTA	ATG	AAG	CGA	GGC	ATG	TCA	AAA	1870
Glu	His	Lys	Ser	Ser	Trp	Glu	Gly	Leu	Met	Lys	Arg	Gly	Met	Ser	Lys	
		610					615					620				
GAC	TTC	ACG	TGG	GAC	CAT	GCC	GCT	GAA	CAA	TAC	GAA	CAA	ATC	TTC	CAG	1918
Asp	Phe	Thr	Trp	Asp	His	Ala	Ala	Glu	Gln	Tyr	Glu	Gln	Ile	Phe	Gln	
	625					630					635					
TGG	GCC	TTC	ATC	GAT	CGA	CCC	TAT	GTC	ATG	TA	AAAAAGGACC	AAAGTGGTGG				1970
Trp	Ala	Phe	Ile	Asp	Arg	Pro	Tyr	Val	Met							
640					645											
TTCCTTGAAG	ATCATCAGTT	CATCATCCTA	TAGTAAGCTG	AATGATGAAA	GAAAACCCCT											2030
GTACATTACA	TGGAAGGCAG	ACCGGCTATT	GGCTCCATTG	CTCCAATGTC	TGCTTTGGCT											2090
GCCTTGCCTC	GATGGACCGG	ATGCAGTGAG	GAATCCAGCC	GAACGACAGT	TTTGAAGGAT											2150
AGGAAGGGGA	GCTGGAAGCA	GTCACGCAGG	CAGCCTCGCC	GTGATTTCATA	TGGAACAAGC											2210
TGGAGTCAGT	TTCTGCTGTG	CCACTCACTG	TTTACCTTAA	GATTATTACC	TGTGTTGTTG											2270
TCCTTTGCTC	GTTAGGGCTG	ATAACATAAT	GACTCATTAG	AAAATCATGC	CTCGTTTTTA											2330

43

TTAACTGAAG TGGACACTTC ATTCTTGC CCGTTTAAAA AAAAAAAAAA AAA

2383

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 649 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Ala	Arg	Gly	Leu	Leu	Ser	Leu	Ser	Ala	Met	Ala	Thr	Pro	Ser	Ala	Val	1	5	10	15
Gly	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Leu	Ala	Arg	Ala	Ala	Trp	Pro	Ala	Ala	Val	20	25	30	
Gly	Asp	Arg	Ala	Arg	Pro	Arg	Arg	Leu	Gln	Arg	Val	Leu	Arg	Arg	Arg	35	40	45	
Cys	Val	Ala	Glu	Leu	Ser	Arg	Glu	Gly	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Met	Pro	50	55	60	
Pro	Ala	Leu	Leu	Ala	Pro	Pro	Leu	Val	Pro	Gly	Phe	Leu	Ala	Pro	Pro	65	70	75	80
Ala	Glu	Pro	Thr	Gly	Glu	Pro	Ala	Leu	Thr	Pro	Pro	Pro	Val	Pro	Asp	85	90	95	
Ala	Gly	Leu	Gly	Val	Leu	Gly	Val	Glu	Pro	Glu	Gly	Ile	Ala	Glu	Gly	100	105	110	
Ser	Ile	Asp	Asn	Thr	Val	Val	Val	Ala	Ser	Glu	Gln	Asp	Ser	Glu	Ile	115	120	125	
Val	Val	Gly	Lys	Glu	Gln	Ala	Arg	Ala	Lys	Val	Thr	Gln	Asn	Ile	Val	130	135	140	
Phe	Val	Thr	Gly	Glu	Ala	Ser	Pro	Tyr	Ala	Lys	Ser	Gly	Gly	Leu	Gly	145	150	155	160
Asp	Val	Cys	Gly	Ser	Leu	Pro	Val	Ala	Leu	Ala	Ala	Arg	Gly	His	Arg	165	170	175	
Val	Met	Val	Val	Met	Pro	Arg	Tyr	Leu	Asn	Gly	Thr	Ser	Asp	Lys	Asn	180	185	190	
Tyr	Ala	Asn	Ala	Phe	Tyr	Thr	Glu	Lys	His	Ile	Arg	Ile	Pro	Cys	Phe	195	200	205	
Gly	Gly	Glu	His	Glu	Val	Thr	Phe	Phe	His	Glu	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	210	215	220	

44

Asp Trp Val Phe      Asp His Pro Ser Tyr His Arg      Gly Asn Leu  
 225                      230                      235                      240

Tyr Gly Asp Lys Phe Gly Ala Phe Gly Asp Asn Gln Phe Arg Tyr Thr  
                          245                      250                      255

Leu Leu Cys Tyr Ala Ala Cys Glu Ala Pro Leu Val Leu Glu Leu Gly  
                          260                      265                      270

Gly Tyr Ile Tyr Gly Gln Asn Cys Met Phe Val Val Asn Asp Trp His  
                          275                      280                      285

Ala Ser Leu Val Pro Val Leu Leu Ala Ala Lys Tyr Arg Pro Tyr Gly  
                          290                      295                      300

Val Tyr Lys Asp Ser Arg Ser Ile Leu Val Ile His Asn Leu Ala His  
                          305                      310                      315                      320

Gln Gly Val Glu Pro Ala Ser Thr Tyr Pro Asp Leu Gly Leu Pro Pro  
                          325                      330                      335

Glu Trp Tyr Gly Ala Leu Glu Trp Val Phe Pro Glu Trp Ala Arg Arg  
                          340                      345                      350

His Ala Leu Asp Lys Gly Glu Ala Val Asn Phe Leu Lys Gly Ala Val  
                          355                      360                      365

Val Thr Ala Asp Arg Ile Val Thr Val Ser Lys Gly Tyr Ser Trp Glu  
                          370                      375                      380

Val Thr Thr Ala Glu Gly Gly Gln Gly Leu Asn Glu Leu Leu Ser Ser  
                          385                      390                      395                      400

Arg Lys Ser Val Leu Asn Gly Ile Val Asn Gly Ile Asp Ile Asn Asp  
                          405                      410                      415

Trp Asn Pro Ala Thr Asp Lys Cys Ile Pro Cys His Tyr Ser Val Asp  
                          420                      425                      430

Asp Leu Ser Gly Lys Ala Lys Cys Lys Gly Ala Leu Gln Lys Glu Leu  
                          435                      440                      445

Gly Leu Pro Ile Arg Pro Asp Val Pro Leu Ile Gly Phe Ile Gly Arg  
                          450                      455                      460

Leu Asp Tyr Gln Lys Gly Ile Asp Leu Ile Gln Leu Ile Ile Pro Asp  
                          465                      470                      475                      480

Leu Met Arg Glu Asp Val Gln Phe Val Met Leu Gly Ser Gly Asp Pro  
                          485                      490                      495

Glu Leu Glu Asp Trp Met Arg Ser Thr Glu Ser Ile Phe Lys Asp Lys  
                          500                      505                      510

Phe Arg Gly Trp Val Gly Phe Ser Val Pro Val Ser His Arg Ile Thr  
                          515                      520                      525

45

Ala Gly Cys Asp Ile Leu Met Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly  
 530 535 540

Leu Asn Gln Leu Tyr Ala Met Gln Tyr Gly Thr Val Pro Val Val His  
 545 550 555 560

Ala Thr Gly Gly Leu Arg Asp Thr Val Glu Asn Phe Asn Pro Phe Gly  
 565 570 575

Glu Asn Gly Glu Gln Gly Thr Gly Trp Ala Phe Ala Pro Leu Thr Thr  
 580 585 590

Glu Asn Met Leu Trp Thr Leu Arg Thr Ala Ile Ser Thr Tyr Arg Glu  
 595 600 605

His Lys Ser Ser Trp Glu Gly Leu Met Lys Arg Gly Met Ser Lys Asp  
 610 615 620

Phe Thr Trp Asp His Ala Ala Glu Gln Tyr Glu Gln Ile Phe Gln Trp  
 625 630 635 640

Ala Phe Ile Asp Arg Pro Tyr Val Met  
 645

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Gly Thr Gly Gly Leu Arg Asp Thr Val Glu Asn Cys  
 1 5 10

46  
Patentansprüche

1. Nucleinsäuremolekül, codierend ein Protein aus Mais mit der biologischen Aktivität einer Stärkesynthase des Typs I, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
  - (a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die unter Seq ID No. 2 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt;
  - (b) Nucleinsäuremolekülen, die die unter Seq ID No. 1 dargestellte Nucleotidsequenz umfassen oder eine komplementäre Sequenz oder eine korrespondierende Ribonucleotidsequenz;
  - (c) Nucleinsäuremolekülen, deren einer Strang mit den unter (a) oder (b) genannten Nucleinsäuremolekülen hybridisiert; und
  - (d) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter (a), (b) oder (c) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht.
2. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, das ein DNA-Molekül ist.
3. DNA-Molekül nach Anspruch 2, das ein cDNA-Molekül ist.
4. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, das ein RNA-Molekül ist.
5. Oligonucleotid, das spezifisch mit einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4 hybridisiert.
6. Vektor, enthaltend ein DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3.
7. Vektor nach Anspruch 6, wobei das DNA-Molekül in sense-Orientierung mit regulatorischen Elementen verknüpft ist, die die Transkription und Synthese einer translatierbaren RNA in pro- oder eukaryontischen Zellen gewährleisten.



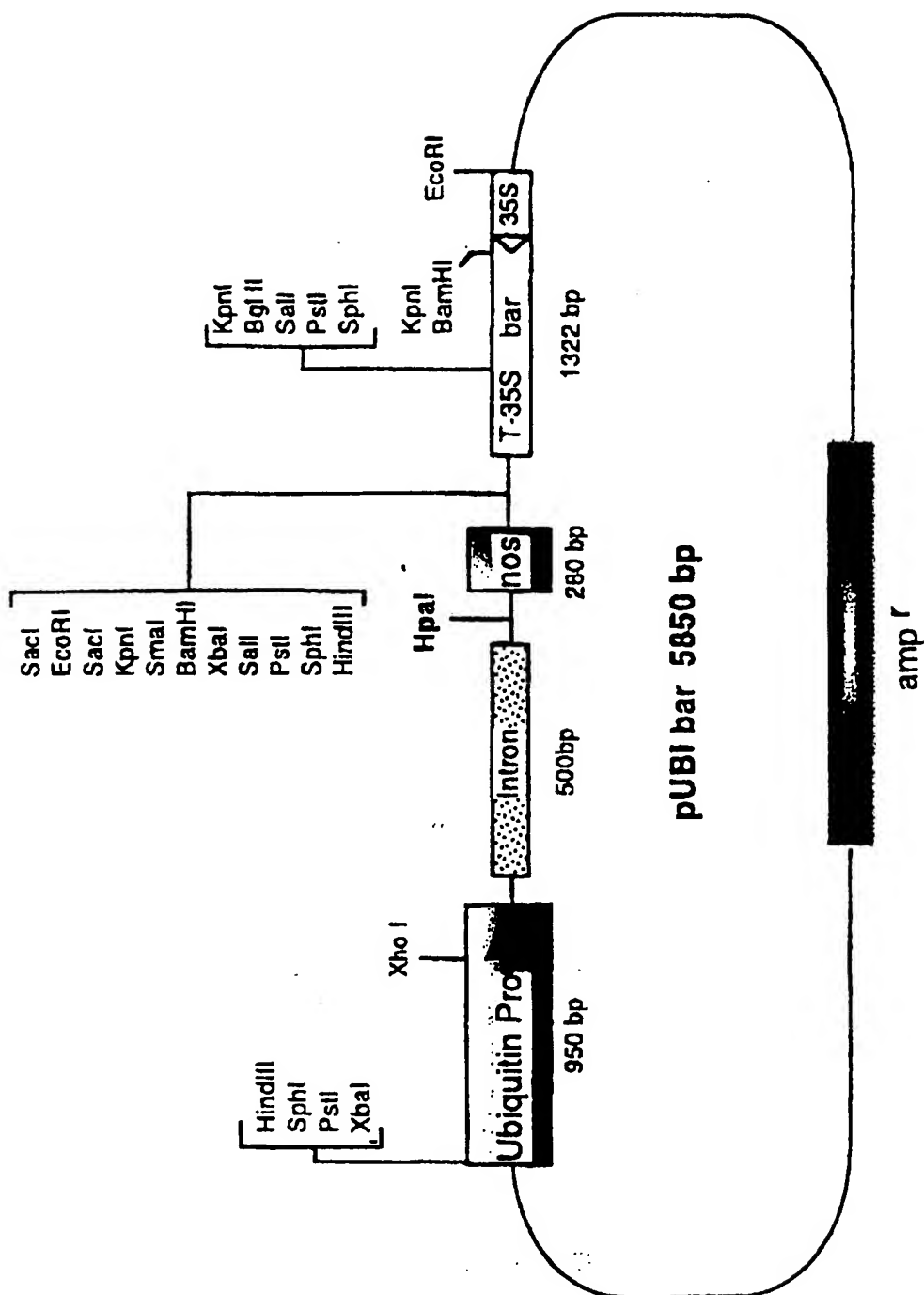
8. Wirtszelle, mit einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder einem Vektor nach Anspruch 6 oder 7 genetisch modifiziert ist.
9. Protein codiert durch ein Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4.
10. Verfahren zur Herstellung eines Proteins nach Anspruch 9 oder eines biologisch aktiven Fragmentes davon, bei dem eine Wirtszelle nach Anspruch 8 unter Bedingungen kultiviert wird, die die Synthese des Proteins erlauben, und das Protein aus den kultivierten Zellen und/oder dem Kulturmedium isoliert wird.
11. Transgene Pflanzenzelle, die mit einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder einem Vektor nach Anspruch 6 oder 7 modifiziert ist, wobei das Nucleinsäuremolekül, das das Protein mit der biologischen Aktivität einer Stärkesynthase codiert, unter der Kontrolle regulatorischer Elemente steht, die die Transkription einer translatierbaren mRNA in pflanzlichen Zellen erlauben.
12. Pflanze, enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 11.
13. Pflanze nach Anspruch 12, die eine Nutzpflanze ist.
14. Pflanze nach Anspruch 13, die eine stärkespeichernde Pflanze ist.
15. Pflanze nach Anspruch 14, die eine Maispflanze ist.
16. Vermehrungsmaterial einer Pflanze nach einem der Ansprüche 12 bis 15, enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 11.
17. Transgene Maispflanzenzelle, die im Vergleich zu den nicht-transformierten Zellen eine Verringerung der Aktivität eines Proteins nach Anspruch 9 aufweist und die stabil in ihr Genom integriert ein rekombinantes Molekül aufweist bestehend aus

- (a) einer in pflanzlichen Zellen aktiven Promotor; und
- (b) einer Nucleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
  - (i) Nucleinsäuresequenzen, die eine antisense-RNA zu einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3 codieren;
  - (ii) Nucleinsäuresequenzen, die ein Ribozym codieren, das spezifisch RNA-Moleküle nach Anspruch 4 spaltet; und
  - (iii) Nucleinsäuresequenzen, die eine sense-RNA für ein Protein nach Anspruch 9 codieren, deren Expression zu einem Cosuppressionseffekt führt.

18. Maispflanze, enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 17.

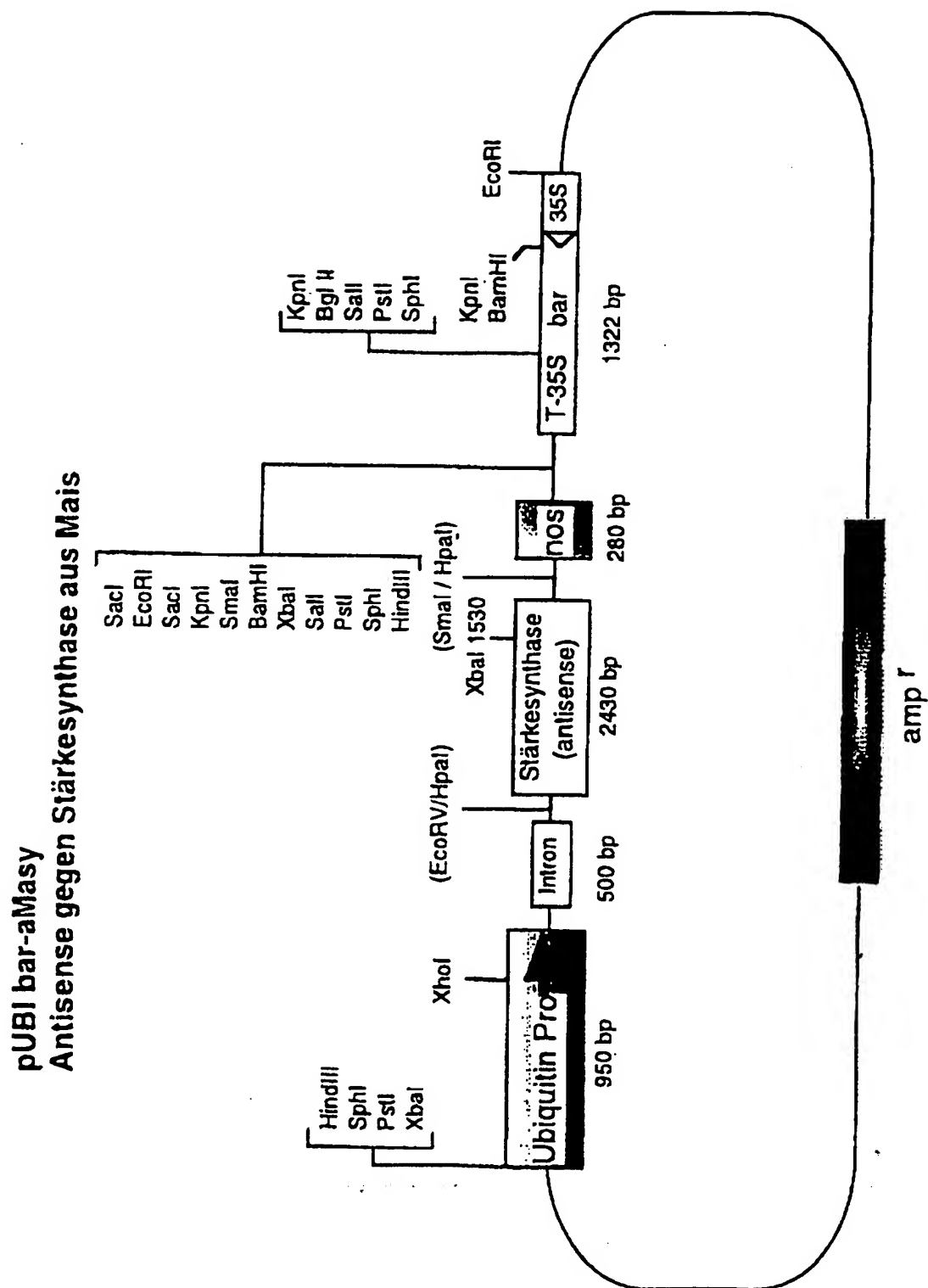
19. Vermehrungsmaterial einer Maispflanze nach Anspruch 18, enthaltend Zellen nach Anspruch 17.

1/2



Figur 1

2/2



Figur 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/02527

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/82 C12N15/00 C12N15/54 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	C. MU ET AL., : "Association of a 76 kDa polypeptide with soluble starch synthase I activity in maize (cv B73) endosperm" THE PLANT JOURNAL, vol. 6, no. 2, 1994, pages 151-159, XP000651922 cited in the application see the whole document	1-10
X	C. HARN ET AL.: "Isolation of a starch synthase cDNA clone from maize inbred line W64A" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 108, no. 2, 1995, page 50 XP000651998 abstract no. 187 see abstract	1-10



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 October 1997

Date of mailing of the international search report

31 10. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rosell, A.M.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No

PCT/EP 97/02527

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	<p>DATABASE WPI  Week 9416 15 March 1994  Derwent Publications Ltd., London, GB;  AN 94128678  XP002043588  &amp; JP 06 070 779 A (MITSUI GYOSAI  SHOKUBUTSU BIO KENKYUSHO) , 15 March 1995  see abstract</p> <p>---</p>	1-14
X	<p>T. BABA ET AL.,: "Identification, cDNA  cloning, and gene expression of soluble  starch synthase in rice (Oryza sativa L.)  immature seeds"  PLANT PHYSIOLOGY,  vol. 103, 1993,  pages 565-573, XP000565731  cited in the application  see the whole document, in particular  Figure 5</p> <p>---</p>	1-10
X	<p>WO 94 09144 A (ZENECA LTD) 28 April 1994  see page 5, line 8 - page 12, line 21  see example 4  see claims 1-17,19-33</p> <p>---</p>	1-19
A	<p>DE 44 41 408 A (INST GENBIOLOGISCHE  FORSCHUNG) 15 May 1996  see the whole document</p> <p>---</p>	1-19
A	<p>DE 43 30 960 A (INST GENBIOLOGISCHE  FORSCHUNG) 16 March 1995  see the whole document</p> <p>---</p>	11-19
E	<p>WO 97 20936 A (ZENECA LTD) 12 June 1997  see SEQ.ID.N.1  see the whole document</p> <p>-----</p>	1-19

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9409144 A	28-04-94	AU 2696492 A EP 0664835 A	09-05-94 02-08-95
DE 4441408 A	15-05-96	AU 3927995 A WO 9615248 A EP 0791066 A	06-06-96 23-05-96 27-08-97
DE 4330960 A	16-03-95	AU 7657394 A CA 2171313 A WO 9507355 A EP 0719338 A HU 74667 A JP 9502098 T	27-03-95 16-03-95 16-03-95 03-07-96 28-01-97 04-03-97
WO 9720936 A	12-06-97	AU 1037197 A	27-06-97

### A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/82 C12N9/10 C12N15/54 A01H

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

### C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>C. MU ET AL., : "Association of a 76 kDa polypeptide with soluble starch synthase I activity in maize (cv B73) endosperm"</p> <p>THE PLANT JOURNAL, Bd. 6, Nr. 2, 1994, Seiten 151-159, XP000651922</p> <p>in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-10
X	<p>C. HARN ET AL.: "Isolation of a starch synthase cDNA clone from maize inbred line W64A"</p> <p>PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 108, Nr. 2, 1995, Seite 50 XP000651998</p> <p>abstract no. 187</p> <p>siehe Zusammenfassung</p> <p>---</p>	1-10

-/--



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



**Siehe Anhang Patentfamilie**

<sup>o</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

**\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist**

\*E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhafte erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

**\*O\*** Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

**\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist**

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

**\*Y\*** Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

**\*8\*** Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

**Datum des Abschlusses der internationalen Recherche**

15. Oktober 1997

Abrevedadum des internationalen Rechercheberichts

31. 10. 97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchebehörde

Europeasches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

**Bevollmächtigter Bediensteter**

Mateo Rosell, A.M.



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE LITERLAGEN

Kategorie <sup>a</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr
X	<p>DATABASE WPI  Week 9416 15.März 1994  Derwent Publications Ltd., London, GB;  AN 94128678  XP002043588  &amp; JP 06 070 779 A (MITSUI GYOSAI  SHOKUBUTSU BIO KENKYUSHO) , 15.März 1995  siehe Zusammenfassung  ---</p>	1-14
X	<p>T. BABA ET AL.,: "Identification, cDNA  cloning, and gene expression of soluble  starch synthase in rice (Oryza sativa L.)  immature seeds"  PLANT PHYSIOLOGY,  Bd. 103, 1993,  Seiten 565-573, XP000565731  in der Anmeldung erwähnt  siehe das ganze Dokument, insbesondere  Figure 5  ---</p>	1-10
X	<p>WO 94 09144 A (ZENECA LTD) 28.April 1994  siehe Seite 5, Zeile 8 - Seite 12, Zeile  21  siehe Beispiel 4  siehe Ansprüche 1-17,19-33  ---</p>	1-19
A	<p>DE 44 41 408 A (INST GENBIOLOGISCHE  FORSCHUNG) 15.Mai 1996  siehe das ganze Dokument  ---</p>	1-19
A	<p>DE 43 30 960 A (INST GENBIOLOGISCHE  FORSCHUNG) 16.März 1995  siehe das ganze Dokument  ---</p>	11-19
E	<p>WO 97 20936 A (ZENECA LTD) 12.Juni 1997  siehe SEQ.ID.N.1  siehe das ganze Dokument  -----</p>	1-19

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokum	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(e) Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9409144 A	28-04-94	AU 2696492 A EP 0664835 A	09-05-94 02-08-95
DE 4441408 A	15-05-96	AU 3927995 A WO 9615248 A EP 0791066 A	06-06-96 23-05-96 27-08-97
DE 4330960 A	16-03-95	AU 7657394 A CA 2171313 A WO 9507355 A EP 0719338 A HU 74667 A JP 9502098 T	27-03-95 16-03-95 16-03-95 03-07-96 28-01-97 04-03-97
WO 9720936 A	12-06-97	AU 1037197 A	27-06-97